

Proteinbiochemische Untersuchungen des  
Siebröhrensaftes von *Hordeum vulgare* zur  
Identifizierung von systemischen Signalen für eine  
erhöhte Resistenz nach Befall mit *Blumeria graminis*

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
eines Doktors der Naturwissenschaften

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

am Fachbereich 08: Biologie und Chemie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von: Diplom-Biologe Torsten Knauer

Gutachter: Prof. Dr. Aart J.E. van Bel  
Prof. Dr. Karl-Heinz Kogel  
Dekan: Prof. Dr. Holger Zorn

eingereicht: Oktober 2012



Die vorliegende Arbeit wurde im Teilprojekt B1 der DFG geförderten Forschergruppe FOR-666 am Institut für Allgemeine Botanik in Gießen angefertigt.

# Inhaltsverzeichnis

## 1 Einleitung

1.1	Das Pathosystem Gerste/Echter Gerstenmehltau	1
1.1.1	Gerste ( <i>Hordeum vulgare</i> )	1
1.1.2	Echter Gerstenmehltau ( <i>Blumeria graminis f.sp. hordei</i> )	1
1.1.3	Die Abwehrmechanismen der Gerste	2
1.2	Systemisch Induzierte Resistenz	6
1.3	Die Funktion des Phloems in der systemisch erworbenen Resistenz	8
1.3.1	Das Phloem	8
1.3.2	Signalmoleküle und Langstreckentransport im Phloem	12
1.4	Die phloemspezifische Probengewinnung	14
1.4.1	Blattlausstylektomie	14
1.4.2	Erleichterte Exsudation mit EDTA	15
1.5	Zielsetzung der Arbeit	17

## 2 Material und Methoden

2.1	Pflanzenmaterial	18
2.2	Aphidenzucht	18
2.3	Inokulation mit <i>Blumeria graminis</i>	18
2.4	Anfärbung der Mehltasporen zur Bestimmung der Inokulationsdichte	20
2.5	Stylektomie	20
2.6	Erleichterte Exsudation mit EDTA	22
2.7	Probenaufbereitung der Proteine aus Exsudationsmedien	23
2.8	Proteinextraktion aus Gerste	23
2.9	SDS-PAGE	24
2.10	Isoelektrische Fokussierung	24
2.11	Färbung der Proteingele	26
2.12	Auswertung der Proteingele	27
2.13	Zuckeranalyse mit Hilfe von <i>High Performance Liquid Chromatographie</i> (HPLC)	27
2.14	Analyse und Identifizierung von Proteinspots	27
2.15	Methyljasmonatbehandlung	28
2.16	DCINA-Behandlung	28
2.17	Bestimmung der Peroxidaseaktivität von Stylektomieproben	28
2.18	Bestimmung des Zellwandanteils nach Befall mit <i>Bgh</i>	28
2.19	HPLC der löslichen Phenolsäuren	29

## 3 Ergebnisse

3.1	Vergleich und Optimierung der phloemspezifischen Probenentnahme aus Gerste	30
3.1.1	SDS-PAGE von EDTA-Proben	30
3.1.2	SDS-PAGE von Stylektomieproben	31
3.1.3	Vergleich der Proteintrennungen aus EDTA- und Stylektomieproben	32
3.1.4	Zweidimensionale Auftrennung der Proteine aus EDTA-Proben	32
3.1.5	Zweidimensionale Auftrennung der Proteine aus Stylektomieproben	36
3.1.6	Identifizierung von phloemspezifischen Proteinen	37
3.1.7	Bestimmung der Phloemspezifität mittels PCR	38
3.1.8	Vergleich der Phloemspezifität mittels Carbohydratanalyse	38
3.2	Phloemspezifische Untersuchungen der Gerste	42
3.2.1	Proteinanalyse von EDTA-Proben nach Inokulation der Gerste mit <i>Bgh</i>	42
3.2.2	Identifizierung der Proteine	43

3.2.3	Quantifizierung und Fluoreszenzfärbung von Referenzproteinen und P23K-3/4	46
3.2.4	Systemischer Einfluss von <i>Bgh</i> auf die Regulierung von P23K-3/4	50
3.2.5	Bestimmung der Phloemspezifität von P23K-3/4	52
3.2.6	Phloemspezifische Proteomanalyse aus Stylektomieproben nach Inokulation mit <i>Bgh</i>	54
3.2.7	Verminderte Stilettexsudation nach Mehltaubefall und Brennreiz	56
3.2.8	Einfluss von Aphiden ( <i>R.padi</i> ) auf P23K-3/4	57
3.2.9	Systemischer Einfluss von <i>Bgh</i> und <i>R.padi</i> auf P23K-3/4	60
3.2.10	Posttranslationale Modifikationen	61
3.2.11	Jasmonsäuremethylester Behandlung	62
3.2.12	DCINA Behandlung	62
3.2.13	Brennreiz	66
3.2.14	Messung der Peroxidaseaktivität in Stylektomieproben aus Gerste	67
3.2.15	Bestimmung der löslichen Phenolsäuren in Gerste nach Befall mit <i>Bgh</i>	69
3.2.16	Bestimmung der Zellwandmasse nach Befall mit <i>Bgh</i>	71
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	
4.1	Etablierung der EDTA- und Stylektomiemethode zur phloemspezifischen Probenentnahme aus <i>Hordeum vulgare</i>	73
4.1.1	Vergleich der Probeentnahmetechniken mittels SDS-PAGE	73
4.1.2	Vergleich der Probeentnahmetechniken mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese	75
4.1.3	Vergleich der phloemspezifischen Sammeltechniken mittels Carbohydratanalyse	79
4.1.4	Veränderung der Carbohydratzusammensetzung in Stylektomieproben nach einer Dunkelphase der Gerste	81
4.2.1	Phloemspezifische Proteinanalyse nach Befall mit <i>Bgh</i>	82
4.2.2	Phloemspezifische Proteinanalyse nach Aphidenbefall ( <i>R.padi</i> )	85
4.2.3	Posttranslationale Modifikation von P23K-3/4	88
4.2.4	Verschlussreaktionen in Siebröhren nach Mehltaubefall und Brennreiz	90
4.2.5	Auswirkung der Jasmonsäuremethylester Behandlung auf P23K-3/4	94
4.2.6	Verminderte Expression von P23K-3/4 nach Behandlung der Gerste mit DCINA	95
4.2.7	Bestimmung der Peroxidaseaktivität im Siebröhrensaft von Gerste	96
4.2.8	Systemisch induzierte Erhöhung von löslichen Phenolsäuren nach Befall mit <i>Bgh</i>	98
4.2.9	Bestimmung der Zellwandmasse nach Befall mit <i>Bgh</i>	99
4.2.10	Fazit	101
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung/Summary</b>	102-103
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	104
	<b>Danksagung</b>	118
	<b>Persönliche Angaben</b>	119
	<b>Erklärung</b>	120

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
<i>Bgh</i>	<i>Blumeria graminis f.sp. hordei</i> (Echter Gerstenmehltau)
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BTH	Benzo(1,2,3)-thiadiazolcarbothionsäure-S-methylester
CDPK	<i>Calcium-dependent protein kinase</i>
CHAPS	(3-[(3-Cholamidopropyl) Dimethylammonio]-1-Propansulfonat)
cv.	Sorte (Kultivar)
d	Tage ( <i>days</i> )
DAB	Diaminobenzidin
DCINA	2,6-Dichlorisonikotinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
f.sp.	forma specialis
h	Stunden ( <i>hours</i> )
hai	Stunden nach Inokulation ( <i>hours after inoculation</i> )
hat	Stunden nach Behandlung ( <i>hours after treatment</i> )
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatographie</i>
HR	Hypersensitive Reaktion
HRP	Meerrettich-Peroxidase
<i>Hv.</i>	<i>Hordeum vulgare</i>
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
JA	Jasmonsäure
kDa	relatives Molekulargewicht (Kilodalton)
M	Molar
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization- time of flight mass spectrometry</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
NADPH	reduziertes Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
nm	Nanometer
PCR	Polymerasekettenreaktion
PAL	Phenylalanin-Ammoniak-Lyase
pH	Potentia Hydrogenii
ppm	<i>parts per million</i>
PPUs	<i>pore-plasmodesmata units</i>
RNA	Ribonukleinsäure
<i>R.padi</i>	<i>Rhopalosiphum padi</i>
PR	<i>pathogenesis related</i>
RUBISCO	Ribulosebisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
SB 3-10	N-Decyl-N,N-Dimethyl-3-Ammonio-1-Propan-Sulfonat
SA	Salicylsäure
SAR	Systemisch erworbene Resistenz ( <i>systemic acquired resistance</i> )
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEL	<i>size exclusion limit</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

TCEP	Tris (2-chlorethyl) phosphat
TEMED	Tetramethylethyldiamin
ü.N.	über Nacht
VIGS	<i>Virus-induced gene silencing</i>
V	Volt

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Pathosystem Gerste/Echter Gerstenmehltau

### 1.1.1 Gerste (*Hordeum vulgare*)

Die Gerste (*Hordeum vulgare*) aus der Familie der monokotylen Süßgräser (Klasse: Liliopsida, Ordnung: Poales, Familie: Poaceae, Unterfamilie: Pooideae, Tribus: Triticeae, Gattung: *Hordeum*) wird in gemäßigten Klimazonen weltweit angebaut und dient hauptsächlich als Nahrungs- und Futtermittel sowie für die Bierherstellung. Das Genom der Gerste ist diploid ( $2n=14$ ) und umfasst ca. 5,4 Milliarden Basenpaare (Badr et al. 2000).

### 1.1.2 Echter Gerstenmehltau (*Blumeria graminis f.sp. hordei*)

*Blumeria graminis f.sp. hordei* (Bgh) ist ein obligat biotropher und hochspezifischer Ektoparasit der Gerste aus der Abteilung der Ascomycota (Klasse: *Leotiomycetes*; Ordnung: *Erysiphales*; Familie: *Erysiphaceae*; Gattung: *Blumeria*; *Blumeria graminis f.sp. hordei*). Die Infektion der Gerste beginnt mit dem Kontakt der Konidiospore auf der Epidermis der Wirtspflanze. Innerhalb von Minuten erfolgt eine Flüssigkeitsabgabe aus dem Konidium, in der Cutinase- und Esterase-Aktivität nachgewiesen wurde und deren Bedeutung vermutlich in der Wirtserkennung und Anhaftung liegt (Pascholati et al. 1992). Nach 0,5-2h bildet sich der erste Keimschlauch zur Anhaftung, Wasseraufnahme und Wirtserkennung. Nach 3-4h kommt es zur Bildung eines zweiten Keimschlauches, der an seinem Ende ein Appressorium (9-10hai) zur Penetration der Wirtszelle bildet. Auch hier erfolgt eine Abgabe von zellwandabbauenden Enzymen, die die Penetration der Zellwand erleichtern (Pryce-Jones et al. 1999). Das Haustorium zur Nährstoffaufnahme bildet sich bereits nach 15-18hai in der Wirtszelle. Dabei bleibt die Plasmamembran der Wirtszelle intakt und die Besiedelung beschränkt sich auf die Epidermiszellen. Nach wenigen Tagen erfolgt die Entwicklung von Sekundärhyphen an der Blattoberfläche, die weitere Zellen penetrieren und Sekundärhaustorien ausbilden.

Der asexuelle Lebenszyklus schließt sich mit der Entwicklung von Sporenträgern an der Blattoberfläche. Hier reifen nach 5-7 Tagen neue Konidien heran, die sich mit dem Wind weiterverbreiten (Carver et al. 1995, Wright et al. 2000). Mit zunehmendem Befall nekrotisiert das Pflanzengewebe und es kommt zu Ernteaussfällen. Der geschlechtliche Zyklus erfolgt im Spätsommer. Im alternden



Mycel bilden sich Ascogonien und Antheridien, die später reife Cleistothecien bilden. Nach der Überwinterung werden aus diesen neue Ascosporen freigesetzt (Schlösser 1997).

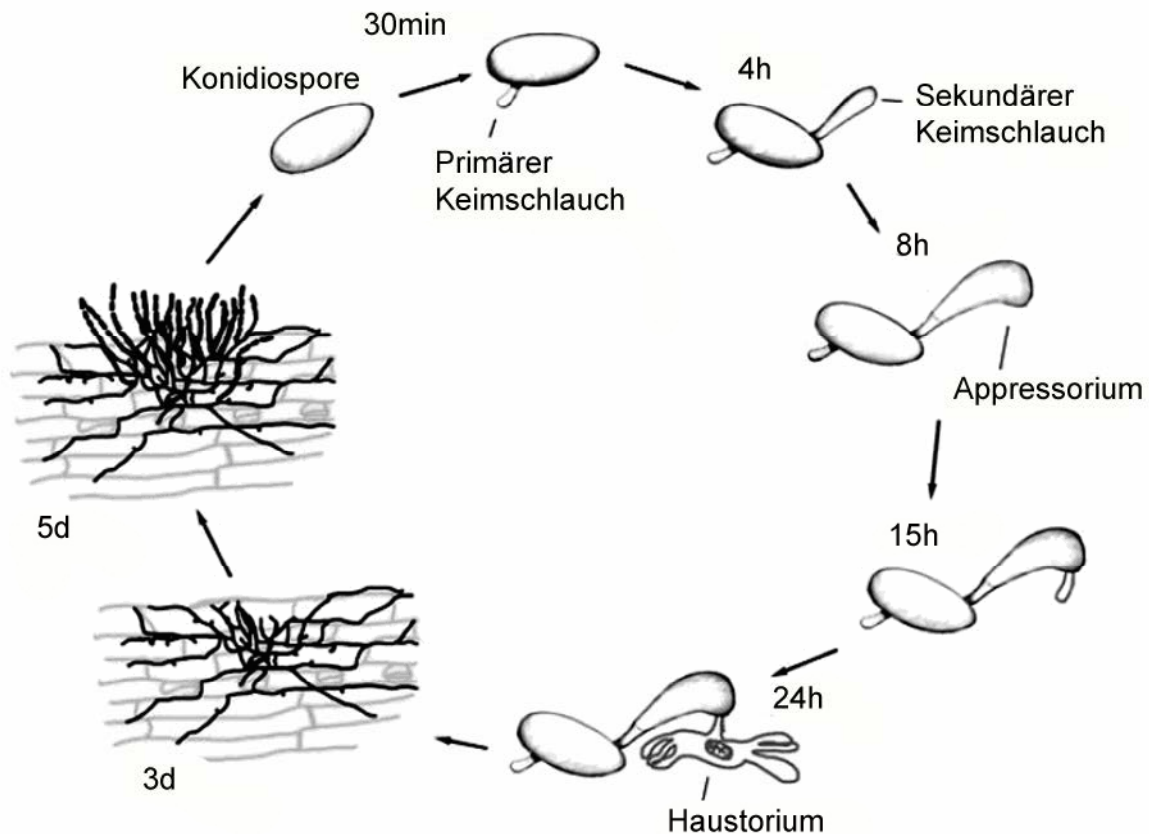


Abb. 1.1 Entwicklungsstadien des Gerstenmehltaus (aus Both et al. 2005)

### 1.1.3 Die Abwehrmechanismen der Gerste

Zu den präformierten Abwehrmechanismen von Pflanzen zählen alle Strukturen, die bereits vor einer Infektion mit einem Pathogen ausgeprägt sind. Dazu gehören die epikutikulären Wachse, die Kutikula und die Zellwand der Epidermis bzw. der Rhizodermis. Daneben existieren noch eine Reihe von konstitutiven Fungiziden bzw. antimikrobiellen Substanzen aus dem Sekundärstoffwechsel wie z.B. Phenole, Saponine, Glycoside und Glucosinolate (Grayer und Harborne 1994, Osbourn 1996). Die induzierte Abwehr setzt im Gegensatz zu den präformierten Komponenten eine Erkennung des Pathogens durch Signalmoleküle voraus. Dazu zählt insbesondere die Erkennung von Elicitoren des Pathogens (Chitinfragmente, Peptide, Proteine) oder die Erkennung von enzymatischen Abbauprodukten aus der Zellwand des Wirtes (Thordal-Christensen 2003). Eine Reihe von Enzymen, die an einer Bildung von Elicitoren beteiligt sind, konnten bereits in Konidiosporen des Mehltaus

identifiziert werden. Aus Konidien von *Blumeria graminis* f. sp. *Tritici* wurde Cellulase-, Pektinase- und Xylanase-Aktivität nachgewiesen, die wahrscheinlich die Penetration der Epidermiszellen erleichtern (Suzuki et al. 1998, Suzuki et al. 1999, Komiya et al. 2003). Eine weitere frühe Reaktion nach Mehltaubefall oder einem Elicitorreiz (z.B. Chitinoligomere) ist der Efflux von Calciumionen aus dem Apoplasten in das Cytosol, sowie eine apoplasmatische Alkalisierung (Felle et al. 2004). Trotz der vielfältigen Reaktionen, die sich durch einen Elicitorreiz induzieren lassen, konnte bislang nur vereinzelt ein spezifischer Rezeptor für Elicitoren identifiziert werden (Hückelhoven 2007). Nach der Erkennung eines Pathogens existieren eine Reihe von (kultivarabhängigen und rassenspezifischen) Abwehrmechanismen, die eine Etablierung des Pilzes verhindern können. Dazu gehören die Zellwandapposition (Papillenbildung), die hypersensitive Reaktion (HR), die Produktion von Phytoalexinen und die Expression von pathogenrelevanten Proteinen.

Durch die Bildung einer lokalen Zellwandverstärkung der Epidermis (Papillenbildung) wird in der rassenunspezifischen *mlo*-Resistenz (*mildew resistance locus O*) das Eindringen des Pilzes verhindert (Abb. 1.2). Außerdem ist eine Akkumulation von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in der Epidermiszelle zu beobachten. Das *Mlo*-Gen ist ein negativer Regulator der Pathogenabwehr und wurde in diversen Varianten durch Mutagenese seit den 40er Jahren verändert. Unabhängig von den künstlich entstandenen Mutanten konnte in den 70er Jahren eine natürlich entstandene Mutation im *Mlo*-Gen identifiziert werden, deren Ursprung in Äthiopien liegt (Jørgensen 1992). Zusätzlich zu der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Produktion konnte im *mlo*-Genotyp eine stärkere Akkumulation der Phenolsäure *p*-coumaroyl-hydroxyagmatin nach Befall mit *Bgh* festgestellt werden. Diese wird den Phytoalexinen zugeordnet, die aus einer Vielzahl von Verbindungen aus dem Sekundärstoffwechsel der Pflanzen hervorgehen, nach Pathogenbefall induziert werden und toxisch auf den eindringenden Pilz wirken. Außerdem wird der Akkumulation von Phenolsäuren an der Penetrationsstelle des Pilzes eine Rolle in der Verstärkung der Zellwand zugeschrieben (von Röpenack et al. 1998). Die Funktion des transmembranen MLO-Proteins ist wahrscheinlich durch Calcium bzw. durch Calmodulin gesteuert (Kim et al. 2002). Für die Proteine MLO und RACB (aus der RAC/ROP G-Protein Familie) konnte auch eine Rolle zur Umorganisation des Cytoskeletts in Richtung der Penetrationsstelle gezeigt werden (Opalski et al. 2005). Außerdem wurden die Gene *Ror1* und *Ror2* (*required for mlo-specified resistance*)

identifiziert, die für eine Funktion von *mlo* in der Abwehr nötig sind. Generell zeigen *Mlo*-Gersten sehr ähnliche Abwehrreaktionen wie *mlo*-Gersten, jedoch sind diese in *mlo*-Gersten schneller Induzierbar (Freialdenhoven et al. 1996; Peterhänsel et al. 1997).

Die rassenspezifische Resistenz *Mla* zeichnet sich durch eine Bildung von toxisch wirkenden reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) aus, die in der erfolgreich penetrierten Epidermiszelle oder in den angrenzenden Mesophyllzellen akkumulieren. Die nachfolgende HR bewirkt ein Absterben der Epidermiszelle oder den angrenzenden Mesophyllzellen und verhindert damit die weitere Ausbildung des Pilzes (Abb. 1.2). Unter den ROS ist  $H_2O_2$  das stabilste Intermediat und es spielt neben der antimikrobiellen Wirkung eine wichtige Rolle in der Verstärkung der Zellwand bzw. der Papille (Thordal-Christensen 1997). Ebenfalls wird für  $H_2O_2$  eine Rolle als *second messenger* zur Aktivierung von Abwehrgenen diskutiert (Chamnongpol et al. 1998, Hückelhoven und Kogel 2003).

Die *Mlg* vermittelte Pathogenabwehr ist ebenfalls eine rassenspezifische Resistenz und reagiert nach Erkennung des entsprechenden Avirulenzgens mit einer Papillenbildung sowie einer HR der Epidermiszelle (Abb. 1.2).

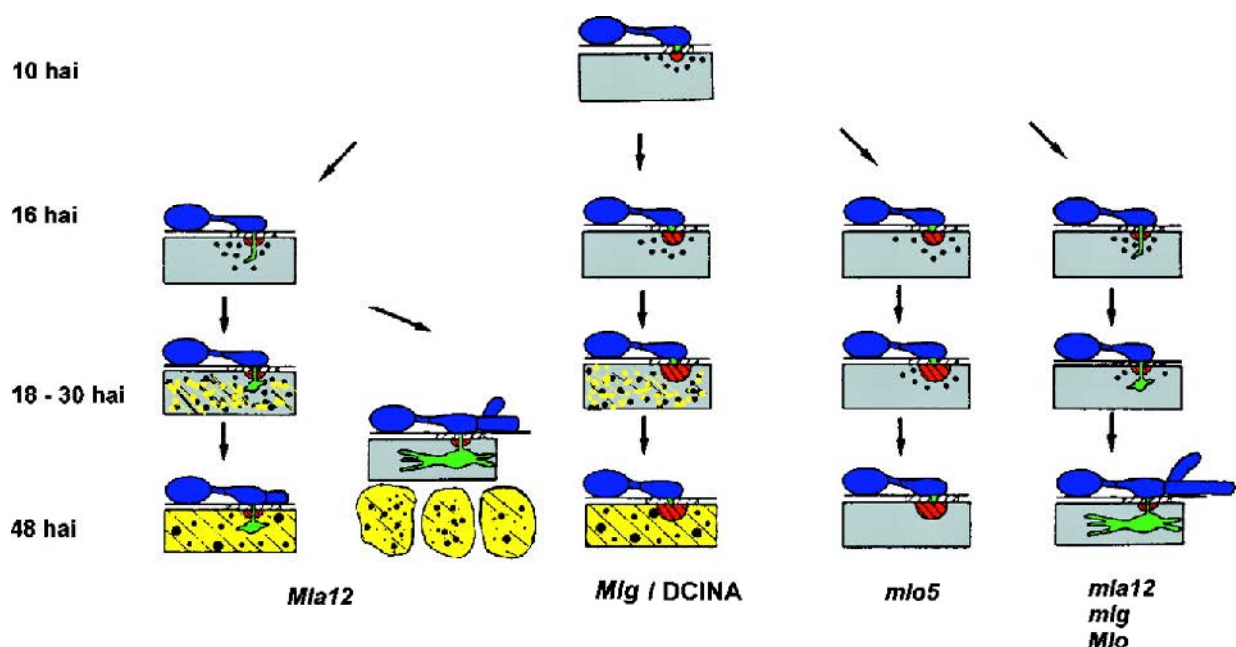


Abb. 1.2 Schematische Darstellung von erfolgreichen Abwehrreaktionen der Gerste nach Befall mit *Bgh* (*Mla12*, *Mlg*, *mlo5*) und der kompatiblen Interaktion mit *Bgh* (*mia12*, *mlg*, *Mlo*). Konidiospore und Keimschlauch mit Appressorium (blau), Haustorium (grün), HR und Zelltod (gelb), Papillenbildung (rot), (aus Hückelhoven et al. 1999)

Neben den induzierbaren niedermolekularen Verbindungen (ROS, Phytoalexine) existieren noch eine Reihe von Proteinen bzw. Enzymen, die an der Pathogenabwehr beteiligt sind. Diese werden als PR-Proteine (*pathogenesis-related proteins*) bezeichnet. Zurzeit sind 18 verschiedene Gruppen von PR-Proteinen mit unterschiedlicher Funktion bekannt. Einige davon wurden in Gerste identifiziert und werden nach einem Befall mit *Bgh* verstärkt exprimiert. Das Protein PR-1b akkumuliert in resistenten (*mlo5*) Gerstenpflanzen nach *Bgh* Befall. Vermutlich wirkt es nicht direkt toxisch auf den Pilz, sondern ist am Aufbau der Papille beteiligt. Eine verminderte Expression von PR-1b bewirkte eine leicht erhöhte Anfälligkeit gegenüber *Bgh* (Schultheiss et al. 2003). Bereits 4h nach Befall mit *Bgh* ist eine Erhöhung der Peroxidaseaktivität (PR-9) festgestellt worden. Auch hier wird eine Verstärkung der Papille durch Polymerisierung der Zellwandbestandteile Lignin und Suberin, sowie von Glycoproteinen vermutet (Thordal-Christensen et al. 1992, Scott-Craig et al. 1995). Ähnliche Funktion wird den Germinen und Germin-ähnlichen Proteinen (GLP, *germine-like-proteins*) zugeordnet. Einige Mitglieder dieser Proteinfamilien lassen sich den Oxalatoxidasen (PR-15) und Oxalatoxidasen ähnlichen Enzymen (PR-16) zuordnen (Christensen et al. 2002). Diese katalysieren die Umsetzung von Oxalat zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{CO}_2$ . Sowohl die Aktivität bzw. die Expression von Oxalatoxidasen (Dumas et al. 1995, Zhang et al. 1995) als auch der Oxalatoxidase-ähnlichen Proteine (Wei et al. 1998) konnte nach einer Infektion mit *Bgh* gezeigt werden. Unter den Oxalatoxidasen-ähnlichen Proteinen konnte außerdem eine Superoxiddismutaseaktivität für das Protein GLP4 nachgewiesen werden (Christensen et al. 2004). Hier konnte eine Überexpression des *HvGLP4*-Gens eine erhöhte Resistenz der Gerste gegenüber dem Mehltau erzeugen. Die PR-Proteine PR-2 (1,3- $\beta$ -Glucanase) PR-3 und PR-8 (Chitinasen) besitzen hydrolytische Aktivität und können damit die Zellwand des Pilzes abbauen. Über die Funktion der PR-Proteine PR-4 (Chitin bindend), PR-5 (*thaumatin-like-proteins*) und PR-14 (*lipid-transfer-protein*) ist zurzeit wenig bekannt, es konnte jedoch eine gesteigerte Expression nach *Bgh*-Befall und eine fungizide Wirkung *in vitro* gezeigt werden (Gregersen et al. 1997, Selitrennikoff 2001, Garcia-Olmedo et al. 1995). Eine direkte toxische Wirkung auf *Bgh* wird auch für die niedermolekularen PR-14 Proteine aus der Thionin-Genfamilie der Gerste vermutet. Besonders in einer resistenten Gerstensorte konnte eine Anhäufung von Thioninen in der Zellwand und in der Papille nach *Bgh*-Befall beobachtet werden (Ebrahim-Nesbat et al. 1989,1993). Die

erhöhte Expression von PR-17a (26KDa) und PR-17b (24KDa) korreliert, wie bei einigen anderen PR-Proteinen, ebenfalls mit dem Zeitpunkt der Penetration durch die Epidermis. Für die PR-17 Proteine wird anhand von Sequenzhomologien eine proteolytische Aktivität vermutet. Ferner wird über eine Rolle im Zellwandmetabolismus und in der Signaltransduktion spekuliert (Christensen et al. 2002). Für PR-6, -7, -10, -11, -12 und -18 wurden bisher noch keine Reaktionen im Pathosystem Gerste/Echter Gerstenmehltau beschrieben (Christensen et al. 2002, van Loon et al. 2006).

## 1.2 Systemisch Induzierte Resistenz

Schon zu Beginn des 20. Jahrhunderts beobachteten Naturwissenschaftler, dass Pflanzen nach einem Pathogenbefall eine erhöhte Resistenz gegenüber einer weiteren Infektion entwickeln. Diese Beobachtungen wurden erstmals von Chester (1933) zusammengefasst. Zudem stellte man eine erhöhte Resistenz von Pflanzenteilen fest, die nicht zuvor mit dem Pathogen in Berührung gekommen waren. Dieses Phänomen wurde als systemisch erworbene/aktivierte Resistenz (SAR, *systemic acquired resistance*) bezeichnet. Nach einer Infektion des Tabaks mit dem Tabak Mosaic Virus konnte eine erhöhte Resistenz gegenüber anderen Viren festgestellt werden. Damit wurde gezeigt, dass eine SAR in Pflanzen nicht dem Antikörpersystem der Tiere folgt. Außerdem wurde eine Involvierung des Leitbündels zur Verteilung eines Resistenzsignals vermutet (Ross 1961). Dies wurde durch Pfropfungsversuche untermauert, bei denen durch eine Infektion des Wurzelstocks eine Resistenz in den nachfolgend aufgepfropften Pflanzenteilen induziert werden konnte (Jenns und Kuć 1979, Dean und Kuć 1986). Nach einer gezielten Unterbrechung des Phloemstroms durch Ringeln waren keine systemischen Effekte mehr zu beobachten (Guedes et al. 1980). Später konnten die zumeist auf Beobachtungen beruhenden Experimente mit einer Akkumulation von PR-Proteinen in systemischen Pflanzenteilen assoziiert werden (Ye et al. 1989, Ye et al. 1990).

Eine zentrale Rolle für die Expression von Abwehrgenen konnte für verschiedene Phytohormone ermittelt werden. Dazu zählen u.a. Salicyl- und Jasmonsäure. Eine Akkumulation von Salicylsäure ist vor allem nach Befall mit biotrophen Pathogenen festzustellen, während Jasmonsäure meist nach Befall mit nekrotrophen Pathogenen und Insektenfraß akkumuliert. Mit dem Protein NPR1 (*nonexpressor of pathogenesis-related genes*) konnte ein zentrales Element in der Regulierung von Salicyl- und

Jasmonsäure abhängigen Signalwegen gefunden werden. Außerdem existieren antagonistische und synergistische Wechselwirkungen mit den Phytohormonen Ethylen, Abscisinsäure und Auxin (Howe und Jander 2008, Vlot et al. 2009, Robert-Seilantantz et al. 2011). Nachdem Salicylsäure nach Pathogenbefall im Phloem von dikotylen Pflanzen nachgewiesen wurde vermuteten einige Autoren, dass Salicylsäure das systemisch transportierte Signal ist (Métraux et al. 1990, Yalpani et al. 1991). Neuere Untersuchungen legen jedoch nahe, dass Salicylsäure essentiell für die Ausbreitung einer SAR ist, diese jedoch nicht von einem Transport von Salicylsäure im Leitbündel abhängt (Vernooij et al. 1994).

Im Gegensatz zu zahlreichen Untersuchungen an Dikotyledonen lässt sich im Pathosystem Gerste/*Bgh* keine Erhöhung der endogenen Jasmon- und Salicylsäurekonzentration nach einer Infektion mit *Bgh* beobachten (Kogel et al. 1995, Vallélian-Bindschedler et al. 1998, Hückelhoven et al. 1999). Trotzdem konnte durch eine Behandlung mit Salicylsäure, bzw. deren chemischen Analoga DCINA (2,6-Dichlorisonicotinsäure) und BTH (Benzo[1,2,3]-thiadiazol-7-carbothioicacid) eine erhöhte Resistenz gegen *Bgh* und die Expression von pathogenrelevanten Transkripten induziert werden (Kogel et al. 1994). Dieses Phänomen beruht auf einer Verteilung der Chemikalien in der Pflanze und wurde als CIR (*chemically induced resistance*) bezeichnet. Auch nach einer exogenen Behandlung von Gerste mit Jasmonsäure konnten hemmende Effekte auf die Entwicklung von *Bgh* festgestellt werden, jedoch konnte die Wirkung nicht mit einer induzierten Resistenz in Verbindung gebracht werden. Die Behandlung mit Jasmonsäure führte zu einer Akkumulation von vermutlich nicht pathogenrelevanten JIPs (*jasmonate inducible proteins*), aber nicht zu einer Anreicherung von PR-Proteinen. Die Autoren gehen daher von einer direkten fungiziden Wirkung von Jasmonsäure auf die Mehltausporen aus (Schweizer et al. 1993).

Obwohl eine SAR in Monokotylen, die dem System der Dikotylen folgt, noch nicht eindeutig gezeigt werden konnte (Wiese et al. 2004, Kogel und Langen 2005), gibt es einige Berichte zu lokalen und systemischen Resistenzinduktionen. In diesen Experimenten konnte eine Inokulation mit Mehltau die lokale Resistenz erhöhen, sodass nach einer weiteren Inokulation deutlich weniger Symptome festzustellen waren (Ouchi et al. 1976, Cho und Smedegård-Petersen 1986, Thordal-Christensen und Smedegård-Petersen 1988). Vereinzelt wird von einer systemisch erhöhten Resistenz gegen Mehltau nach verschiedenen Behandlungen berichtet. Matsuo et al.



(2001) konnten eine systemisch erhöhte Resistenz gegen *Bgh* nach Verwundung des ersten Blattes induzieren. Die Effekte wurden hier auf eine verstärkte Synthese des Indolalkaloids Gramin zurückgeführt. Mitchell und Walters (2004) berichten von systemischen Effekten in Gerste nach Behandlung der ersten Blätter mit Kaliumphosphat. Hier konnte in den zweiten Blättern eine erhöhte Aktivität der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase-, Peroxidase- und Lipoxygenaseaktivität gezeigt werden. Diese Enzyme werden generell mit Abwehrreaktionen in Verbindung gebracht. Ebenso wurde, kontrovers zu anderen Autoren, über eine systemisch vermittelte Resistenz gegen *Bgh* nach einer Jasmonsäurebehandlung berichtet (Walters et al. 2002).

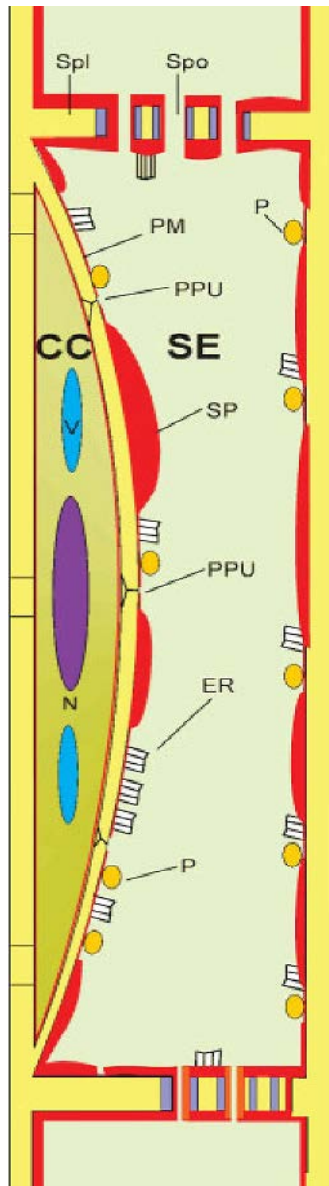
Eine weitere Form der systemisch erworbenen Resistenz ist die Induzierte systemische Resistenz (ISR). Diese wird hauptsächlich durch wurzelbesiedelnde Rhizobakterien und wurzelbesiedelnde Pilze vermittelt. Nach einer Besiedlung der Gerste mit *Piriformospora indica* (Basidiomycet) konnte u.a. eine erhöhte Resistenz gegen *Bgh* durch eine verstärkte Papillenbildung und vermehrte HR-Reaktionen beobachtet werden (Waller et al. 2005).

### **1.3 Die Funktion des Phloems in der systemisch erworbenen Resistenz**

#### **1.3.1 Das Phloem**

Als Phloem bezeichnet man die funktionelle Einheit des Siebelement-Geleitzellen Komplexes im Leitbündel. Eine der wichtigsten Funktionen des Phloems besteht in der Verteilung von Photoassimilaten aus den photosynthetisch aktiven Pflanzenteilen zu den photosynthetisch inaktiven Geweben (z.B. Frucht, Wurzel, Blüte). Durch die Siebelemente, die durch Siebplatten symplasmatisch miteinander verbunden sind und durch die starke Reduktion von Zellorganellen können die Assimilate relativ ungehindert transportiert werden. Die verbleibenden Zellorganellen in den Siebelementen (Abb. 1.3) sind ein parietales endoplasmatisches Retikulum, Plastiden und Mitochondrien (van Bel 2003). Im Gegensatz zu früheren Veröffentlichungen gibt es neuere Erkenntnisse für die Existenz eines Zytoskeletts in Siebröhren. Dieses konnte bereits in den Siebelementen von *Vicia faba* visualisiert werden (persönliche Mitteilung Dr. Jens Hafke). In Gerste und anderen Poaceen konnten dick- und dünnwandige Siebelemente identifiziert werden (Abb. 1.4), wobei die dickwandigen Siebelemente nicht mit Geleitzellen assoziiert sind (Evert et al. 1996, Botha und Cross 1997). Die genaue Funktion der dickwandigen Siebelemente

konnte bislang noch nicht geklärt werden, jedoch wird den dünnwandigen Siebröhren eine Hauptfunktion bezüglich Beladung und Langstreckentransport zugeschrieben (Matsiliza und Botha 2002).



**Abb. 1.3 Schematische Darstellung eines Siebelement-Geleitzellen Komplexes:**

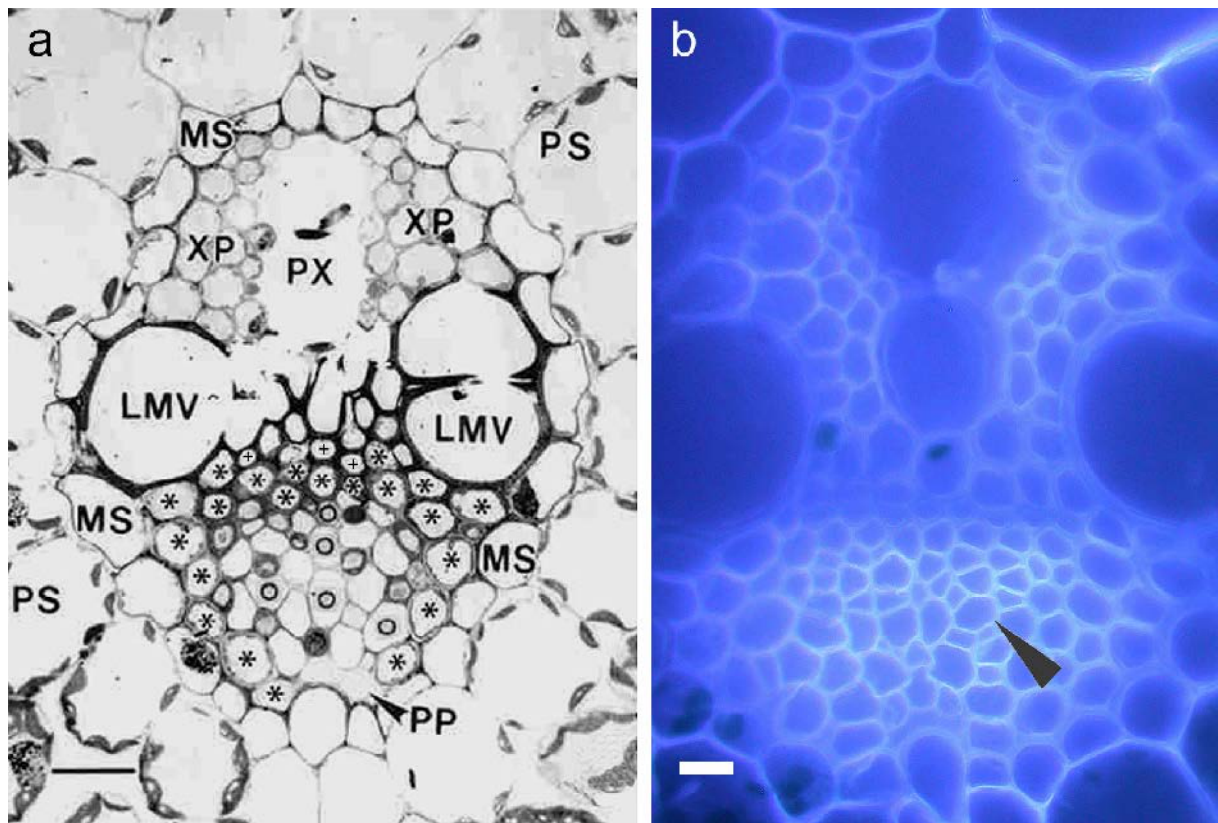
SE Siebelement  
 PM Plasmamembran  
 ER parietales endoplasmatisches Retikulum  
 P Plastiden  
 SP strukturelle Proteine (bei Dikotyledonen)  
 PPU Plasmodemen  
 Spl Siebplatten  
 Spo Siebporen (ca. 0,2-1µm)  
 CC Geleitzelle  
 V Vakuole (blau)  
 N Zellkern der Geleitzelle

**Aus: van Bel und Hess 2003**

Die Triebkraft für den Massenstrom wurde durch die Münch-Hypothese beschrieben. Demnach entsteht in den Beladungszonen (*source*) der Photoassimilate durch passiven Wassereinstrom in die Siebelemente ein erhöhter Druck. Durch die Abgabe der transportierten Carbohydrate im verbrauchenden Gewebe (*sink*) mit entsprechendem passiven Wasserausstrom baut sich ein Druckgradient auf, der als treibende Kraft zwischen *source* und *sink* wirkt (Münch 1930). Die Druckstromtheorie von Münch konnte durch direkte Druckmessungen im Phloem mit Hilfe von abgetrennten Blattlausstyletten experimentell bestätigt werden (Gould et al. 2005).



In Poaceae wurde bisher ausschließlich Saccharose als Transportzucker identifiziert (Fukumori und Chino 1982, Hayashi und Chino 1986, Winter et al. 1992). Die Beladung der Siebelemente in Gerste (Abb. 1.4) mit Saccharose erfolgt apoplastisch (Evert et al. 1996, Botha und Cross 1997). Die Saccharose diffundiert entlang eines Konzentrationsgradienten über Plasmodesmen von den Mesophyllzellen bis zum Siebelement-Geleitzellenkomplex. Dort erfolgt ein aktiver Transport von Saccharose aus dem Apoplasten über einen membranständigen  $H^+$ -Saccharose-Symporter in das Siebelement. Eine  $H^+$ -ATPase liefert den dafür benötigten Protonengradient (van Bel 2003). Der entsprechende Saccharose Transporter (SUT, *sucrose transporter*) konnte zunächst aus Spinat (Riesmeier et al. 1992, 1994) und später aus Gerste isoliert werden (Weschke et al. 2000).



**Abb. 1.4** Querschnitt durch ein Leitbündel der Gerste

a) Elektronenmikroskopische Aufnahme: LMV Metaxylem, PX Protoxylem, PP Meta- und Protophloem, o dünnwandige Siebelemente mit angrenzender Geleitzelle, + dickwandige Siebelemente, \* Leitbündelparenchymzelle, MS Leitbündelscheidezelle, PS Parenchymatische Leitbündelscheidezelle, XP Xylemparenchym, Maßstab 16,7µm, (aus Evert et al. 1996)

b) Lichtmikroskopische Aufnahme nach *Calcofluor white* Färbung ( $\beta$ -Glucan Färbung). Zu erkennen ist eine erhöhte Fluoreszenz der dünnwandigen Siebelemente (Pfeil), Maßstab 10µm

Die ebenfalls aus einer inäqualen Teilung der Mutterzelle hervorgehenden Geleitzellen übernehmen die metabolische und genetische Versorgung des Siebelementes. Siebelement und Geleitzelle sind durch spezielle Plasmodesmen, die so genannten PPU (*pore-plasmodesmata units*), miteinander verbunden. Neben den transportierten Zuckern, Ionen, Lipidmolekülen, Aminosäuren, Mineralien und Phytohormonen lassen sich noch eine Vielzahl von Makromolekülen im Siebröhrensaft finden, deren Funktion vermehrt Aufmerksamkeit findet. Dazu zählen Proteine, Polypeptide und RNA-Spezies (van Bel 2003).

Besonders die Proteine konnten in letzter Zeit im großen Umfang identifiziert werden, jedoch lies sich die mögliche Funktion meist nur über Datenbankhomologien ableiten. Im Siebröhrensaft von *Cucurbita* konnten z.B. über 1100 Proteine aus einem Datenbankvergleich mit *Arabidopsis*, Pappel und Reis identifiziert werden (Lin et al. 2009). Phloemspezifische Transkriptionsprofile lassen ebenfalls auf mehr als 1000 verschiedene Transkripte im Siebröhrensaft von Melone schließen (Omid et al. 2007). Auch in Reis konnten bereits über 100 verschiedene Phloemproteine identifiziert werden (Aki et al. 2008). In einer zweidimensionalen Auftrennung von phloemspezifischen Proben aus Gerste konnten ebenfalls über 200 Proteinspots im Proteingel aufgetrennt werden (Gaupels et al. 2008).

Durch die fehlende Syntheseleistung der Siebelemente müssen die Makromoleküle über PPU transportiert werden. Im Gegensatz zu Plasmodesmen in Mesophyllzellen, die ein SEL (*size exclusion limit*) von <1KDa aufweisen (Derrick et al. 1990), das unter dem Einfluss von viralen *movement* Proteinen auf bis zu 35KDa erhöht werden kann (Fujiwara et al. 1993), konnte für PPU in *Arabidopsis* ein Transport von 67KDa Molekülen ins Siebelement nachgewiesen werden (Stadtler et al. 2005). Im Phloem von *Cucurbita* lassen sich sogar 200KDa große Proteine finden (Balachandran et al. 1997). Der Transport von Makromolekülen und dessen Spezifität werden derzeit noch diskutiert. Vermutlich sind Chaperone an der Faltung von Proteinen beteiligt, wodurch ebenfalls ein selektiver Transport durch die PPU ermöglicht wird (Schobert et al. 1995, Aoki et al. 2002). Des Weiteren legen Vergleiche von phloemspezifischen Transkriptionsprofilen nahe, dass die Siebelemente eine sehr individuelle Makromolekülausstattung besitzen. So sind beispielsweise photosynthetisch relevante Transkripte stark unterrepräsentiert (Doering-Saad et al. 2006, Omid et al. 2007).

### 1.3.2 Signalmoleküle und Langstreckentransport im Phloem

Trotz der umfangreichen Indizien, dass das Phloem essentiell für eine Verbreitung eines systemischen Signals in Pflanzen ist, konnten bis heute nur wenige Signalmoleküle identifiziert werden, die zweifelsfrei im Phloem über große Distanzen transportiert werden und in systemischen Pflanzenteilen an einer SAR beteiligt sind bzw. eine spezifische Reaktion im Zielgewebe vermitteln.

Der Transport des Polypeptids Systemin konnte anhand von  $^{14}\text{C}$ -Markierungen im Phloemexsudat von Tomatenpflanzen bewiesen werden (Pearce et al. 1991, Narváez-Vásquez et al. 1995). Systemin wird nach einer Verwundung, z.B. durch Fraßfeinde aus Prosystemin abgespalten und bewirkt eine Expression von Proteaseinhibitoren, die Synthese von Jasmonsäure und die Produktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  im Leitbündel. Hierbei wirkt  $\text{H}_2\text{O}_2$  als *second messenger*, welcher in Mesophyllzellen die Expression von Abwehrgenen induziert (Orozco-Cárdenas et al. 2001). Aktuellere Ergebnisse legen nahe, dass eine Jasmonsäureproduktion an der Verwundungsstelle essentiell für eine systemische Signalierung ist und das Systemin die Jasmonsäuresynthese entlang der Transportroute im Leitbündel stimuliert (Li et al. 2002).

Im Gegensatz zum Systemin, dessen Vorkommen zurzeit nur für Solanaceen nachgewiesen ist, wird Jasmonsäure auch in anderen Pflanzenspezies eine wichtige Rolle in der Pathogenabwehr zugesprochen und als systemisches Signal diskutiert. In *Arabidopsis* konnte AtPep1 identifiziert werden, ein Polypeptid, das sehr ähnliche Reaktionen wie Systemin (Aktivierung von Abwehrgenen,  $\text{H}_2\text{O}_2$  Synthese) vermittelt und ebenfalls durch Verwundung und Jasmonsäure induziert wird (Huffaker et al. 2006).

Mit der Entdeckung des FT-Proteins (*flowering locus T*) konnte ebenfalls ein phloemspezifisches Signal identifiziert werden. Der Transport des FT-Proteins erfüllt alle Kriterien eines Langstreckensignals und induziert im Sprossapex die Blütenbildung in Abhängigkeit der Tageslänge (Corbesier et al. 2007). Auch in Reis konnte das orthologe Protein Hd3a, sowie in Gerste das orthologe Gen VRN3 zu FT identifiziert werden (Tamaki et al. 2007, Yan et al. 2006).

Neben den Proteinen bzw. Polypeptiden konnten in den letzten Jahren verstärkt RNA-Spezies identifiziert werden, die zur systemischen Signalvermittlung in Pflanzen beitragen. Dabei konnte allerdings nur vereinzelt der Transport im Phloem gezeigt werden. In Kartoffel wird z.B. die Knollenbildung (Banerjee et al. 2006), in Tomate

und *Arabidopsis* die Blattentwicklung (Haywood et al. 2005) und in Kürbis die Entwicklung des Meristems (Ruiz-Medrano et al. 1999) über systemisch transportierte mRNAs gesteuert. Zunehmend wurden auch pathogenrelevante RNAs im Phloem verschiedener Pflanzenspezies identifiziert. Im Siebröhrensaft von *Cucurbita* konnte z.B. die mRNA des WRKY-Transkriptionsfaktors gefunden werden, einem Protein, das auch in Gerste eine wichtige Funktion zur Abwehr von *Bgh* zugeschrieben wird. Das WRKY-Homolog in Gerste ist ein negativer Regulator der Pathogenabwehr und vermittelt vermutlich als Transkriptionsfaktor die Expression von PR-1 Genen (Eckey et al. 2004). Aus der mRNA, die mit Hilfe von phloemspezifischen Stylektomieproben der Gerste gewonnen wurde, konnte durch einen cDNA-AFLP (cDNA *amplified fragment length polymorphism*) ein pathogenrelevantes Homolog zu WIR1 (*wheat Induced resistance 1*) gefunden werden (Gaupels et al. 2008). Für WIR1 konnte bereits eine Hochregulierung nach dem Befall von Weizen mit *Puccinia striiformis* (Gelbrost) und in Gerste nach Befall mit *Bgh* gezeigt werden (Coram et al. 2010, Jansen et al. 2005, Douchkov et al. 2011). Ebenso konnte auch eine Pathogenrelevanz für WIR1 nach dem Befall der Gerste mit *Rhopalosiphum padi* festgestellt werden (Delp et al. 2009).

Während sich die meisten Untersuchungen der letzten Jahre auf mRNAs zur systemischen Signalierung beschränkten, konnten in letzter Zeit vermehrt sehr kurze RNA-Spezies (smRNAs, *small RNAs*) in Siebelementen gefunden werden. Dazu gehören die miRNAs (*microRNAs*) und siRNAs (*short-interfering RNAs*). Über eine phloemspezifische Funktion ist derzeit wenig bekannt, jedoch konnte bereits eine Regulierung für miRNAs nach Stressbehandlung im Siebröhrensaft von *Brassica napus* nachgewiesen werden (Buhtz et al. 2008).

In *Arabidopsis* konnte mit dem Lipid Transfer Protein DIR1 (*defective in induced resistance*) ein Hinweis auf ein systemisch transportiertes Lipid gefunden werden. Nach einer Infektion der *dir1*-Pflanze mit *Pseudomonas syringae* war eine lokale Abwehr durch die Expression von PR-Transkripten festzustellen, jedoch konnte kein SAR-Signal mehr übertragen werden. Allerdings konnte das im Phloem transportierte Lipid noch nicht identifiziert werden (Maldonado et al. 2002).

Neben der systemischen Signalweiterleitung durch Makromoleküle existierten in Pflanzen auch elektrisch vermittelte Langstreckensignale. Anhand von Mikroelektroden, die durch abgetrennte Mundwerkzeuge von Aphiden mit den Siebröhren verbunden waren, konnten Aktionspotentiale im Phloem abgeleitet

werden. An der Entstehung von pflanzlichen Aktionspotentialen sind Calcium-, Chlorid- und Kaliumionen beteiligt (Fromm und Bauer 1994). Neben dem vaskulären Apoplasten konnte in Siebelementen das ER als alternative Quelle für Calciumionen gezeigt werden (Furch et al. 2009). Für Aktionspotentiale der Gerste konnte bereits eine Geschwindigkeit von 20-30cm/min ermittelt werden (Felle und Zimmermann 2007).

Neben dem Phloem erfüllt auch das Xylem die Funktion als Langstreckentransportbahn in Pflanzen. Ebenso können Phloem und Xylem vernetzt sein, um eine systemische Verteilung von Signalen zu gewährleisten. Außerdem kann eine systemische Verteilung von Signalmolekülen durch volatile (gasförmige) Signalmoleküle erfolgen (Heil und Ton 2008).

#### **1.4 Die phloemspezifische Probengewinnung**

Aufgrund der tief im Gewebe lokalisierten Siebelemente ist eine phloemspezifische Probenentnahme generell problematisch. Als etablierte Methoden gelten die Probenentnahme aus abgetrennten Mundwerkzeugen von phloemsaugenden Insekten (Stylektomie), die erleichterte Exsudation mit EDTA aus abgetrennten Pflanzenteilen und die direkte Entnahme von Siebröhrensaft, der in einigen Pflanzenspezies nach Verwundung austritt. Die meisten phloemspezifischen (Protein)-Untersuchungen beschränken sich auf Pflanzenspezies, die nach Anstechen der Leitbündel bzw. der Durchtrennung der Sprossachse, spontan Siebröhrensaft abgeben (Kehr 2006). Dazu gehören z.B. *Cucurbita* (Haebel und Kehr 2001), *Ricinus* (Barnes et al. 2004) und *Brassica napus* (Giavalisco et al. 2006). Gerste und andere Monokotyledonen zeigen keine spontane Abgabe von Siebröhrensaft nach Verwundung, sodass hier auf die Stylektomie- oder EDTA-Methode zurückgegriffen werden muss.

##### **1.4.1 Blattlausstylektomie**

Bereits 1943 wurde eine Exsudation aus abgetrennten Mundwerkzeugen von Schildläusen beschrieben (Yust und Fulton 1943) und die Methode 1977 durch die Verwendung eines Hochfrequenzpulses zum Abtrennen der Mundwerkzeuge entscheidend verbessert (Downing und Unwin 1977). In Abhängigkeit der Größe der Insekten finden ebenso Mikroscheren und Mikromesser sowie Festkörperlaser Verwendung. Die Exsudationsdauer variiert in Abhängigkeit der verwendeten



Pflanzen zwischen wenigen Minuten bis zu mehreren Tagen. Besonders in Monokotylen ist eine relativ lange Exsudationsdauer zu erwarten (Fisher und Frame 1984). Vermutlich existieren in Siebelementen von Dikotyledonen effektivere Verschlussmechanismen, die schnell wieder aktiviert werden, wenn kein Aphidenspeichel mehr in das Siebelement abgegeben wird (van Bel 2006). Normalerweise verhindert der wässrige Aphidenspeichel die Verschlussreaktion der Siebelemente während der Nahrungsaufnahme. Vermutlich sind hier calciumbindende Proteine beteiligt, die ein Calciumsignal zum Verschluss durch Phloemproteine unterbinden und den calciumabhängigen Verschluss der Siebplatten durch Callosesynthese verhindern (Will et al. 2007). Mit Hilfe des Gelspeichels wird zusätzlich die Einstichstelle des Stilettts an der Siebelementzellwand abgedichtet (Will und van Bel 2006). Auch hier wird dem Influx von Calciumionen in das Siebelement und einem Turgorverlust entgegengewirkt. Die zeitlich begrenzte Probenentnahme aus abgetrennten Blattlausstyletten lässt sich ebenfalls mit der Ablagerung von koagulierten Phloemproteinen im Nahrungskanal des Aphidenstiletts erklären (Tjallingii und Hogen-Esch 1993). Ein Nachteil der Stylektomiemethode liegt im hohen Aufwand, insbesondere wenn die Probe zum Schutz vor Verdunstung unter Öl gesammelt wird. Dies ermöglicht wiederum eine Volumen- und Konzentrationsbestimmung der Probe. Ein weiterer Nachteil liegt in der schlecht einschätzbaren Auswirkung der verwendeten Aphiden auf die Zusammensetzung des Siebelementsafte. Bisherige Untersuchungen zu den Auswirkungen von Blattläusen und anderen phloemsaugenden Insekten belegen umfangreiche Reaktionen der befallenen Pflanze, allerdings beruhen die meisten Untersuchungen nicht auf einer phloemspezifischen Probenentnahme (Thompson und Goggin 2006).

#### **1.4.2 Erleichterte Exsudation mit EDTA**

Die erleichterte Exsudation mit EDTA wurde erstmals 1974 von King und Zeevaart für Untersuchungen des Zuckertransports beschrieben und angewandt (King und Zeevaart 1974). In den 80er Jahren konnte die Calciumabhängigkeit der 1,3- $\beta$ -Glucansynthase (Callosesynthase) und damit auch die hemmende Wirkung des Komplexbildners EDTA auf den Verschluss von Siebplatten im Siebelement erklärt werden (Kauss et al. 1983). Für die Probengewinnung wird die Sprossachse bzw. das Blatt durchtrennt und die Schnittfläche in einer EDTA-Lösung aufbewahrt. Methodisch bedingt ist während einer Anreicherung von Siebelementsäften im

Exsudationsmedium auch mit einer Kontamination aus den angeschnittenen Zellschichten zu rechnen. Zudem wird eine membranschädigende Wirkung von EDTA vermutet, wodurch zusätzlich mit einer Anreicherung von membrangebundenen Makromolekülen im Exsudationsmedium zu rechnen ist (Pate 1980, Girousse et al. 1991). Aufgrund des unbekannten Anteils von Siebelementsäften im Exsudationsmedium lassen sich außerdem keinerlei Konzentrationsbestimmungen durchführen. Dennoch konnte in einer vergleichenden Untersuchung von Aminosäureprofilen aus Stylektomie- und EDTA-Proben der Gerste eine gute Übereinstimmung zwischen den beiden Methoden gefunden werden (Weibull et al. 1990). Trotz der umfangreichen Untersuchungen auf Aminosäureebene wurde die EDTA-Methode in der Vergangenheit nur vereinzelt und nicht in Gerste zur Proteomanalyse des Phloems genutzt (Martenes und Grusak 1998; Hoffmann-Benning et al. 2002). Der Vorteil der erleichterten Exsudation mit EDTA liegt damit hauptsächlich in der einfachen Anwendung zur Gewinnung einer phloemspezifischen Probe. Zudem existieren für viele Pflanzen kaum alternative Methoden, wenn keine geeignete Pflanze-/Aphidenkombination für die Stylektomie verfügbar ist.

### **1.5 Zielsetzung der Arbeit**

Im methodischen Teil der Arbeit soll zunächst die phloemspezifische Probengewinnung aus Gerste mit Hilfe der erleichterten Exsudation in Hinblick auf proteinbiochemische Untersuchungen etabliert werden. Der Hauptvorteil liegt hierbei in der relativ schnellen Probengewinnung. Außerdem lassen sich mit der EDTA-Methode Veränderungen in der Zusammensetzung des Siebröhrensaftes ausschließen, welche möglicherweise durch die in der Stylektomie eingesetzten Aphiden induziert werden. Anhand von eindimensionalen Proteingelen werden verschiedene Bedingungen wie z.B. die EDTA-Konzentration, die Exsudationsdauer und die Lichtbedingungen beurteilt. Parallel dazu wird die Probenentnahme mittels Stylektomie erlernt, um ein zweifelsfrei phloemspezifische Referenzprobe zu erhalten. Auch hier sollen verschiedene Parameter mit Hilfe von eindimensionalen Proteingelen geprüft werden. Für eine eindeutige Identifizierung von Phloemproteinen aus der EDTA-Probe muss für beide Sammelmethoden die Probenvorbereitung für eine zweidimensionale Proteintrennung optimiert werden.

Nach der Identifizierung von phloemspezifischen Proteinen der EDTA-Probe liegt der Schwerpunkt auf Veränderungen im Proteinmuster der Siebelemente nach Mehltaubefall. Mit Hilfe der EDTA-Methode sollen mögliche Veränderungen zeitlich eingeordnet und anschließend mit der Stylektomiemethode reproduziert werden. Durch eine lokal begrenzte Inokulation von Mehltau mit entsprechender Probenentnahme soll außerdem zwischen lokalen und systemischen Effekten unterschieden werden. Für weitere Informationen (Aminosäuresequenz, konservierte Domänen, Literaturhinweise) ist eine Identifizierung der Proteine mittels Massenspektrometrie nötig. In Abhängigkeit der verfügbaren Informationen können neue Experimente entwickelt werden, die eine funktionelle Einordnung von Proteinen nach Mehltaubefall ermöglichen.

Neben dem Proteomschwerpunkt der Arbeit sollen weitere Veränderungen in der Zusammensetzung des Siebröhrensaftes nach Mehltaubefall untersucht werden. Dazu gehören beispielsweise Messungen von Zuckern, Phytohormonen und pathogenrelevanten Enzymen. Aufgrund der geringen Probenmenge ist hier die Empfindlichkeit der jeweiligen Messung zu beachten.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Pflanzenmaterial

Die verwendeten Gerstenpflanzen (*Hordeum vulgare* cv. Pallas, Pallas *mlo5*, Golden Promise, Auriga) wurden in einem Substrat aus Komposterde, Torf und Sand im Verhältnis 3:3:1 mit Zugabe von Mehrnährstoffdünger (Triabon 16-8-12-(+4), Compo) unter einer Lichtintensität von  $180\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Philips SON-T Agro 400, HRI-BT 400, Radium Lampenwerk, Wipperfürth) 21 Tage (4-Blatt Stadium) in 300ml Töpfen angezogen. Die relative Luftfeuchte betrug 70%. Die Lichtphase dauerte 16h/Tag bei einer Temperatur von 20°C. Während der Dunkelphase betrug die Temperatur 18°C.

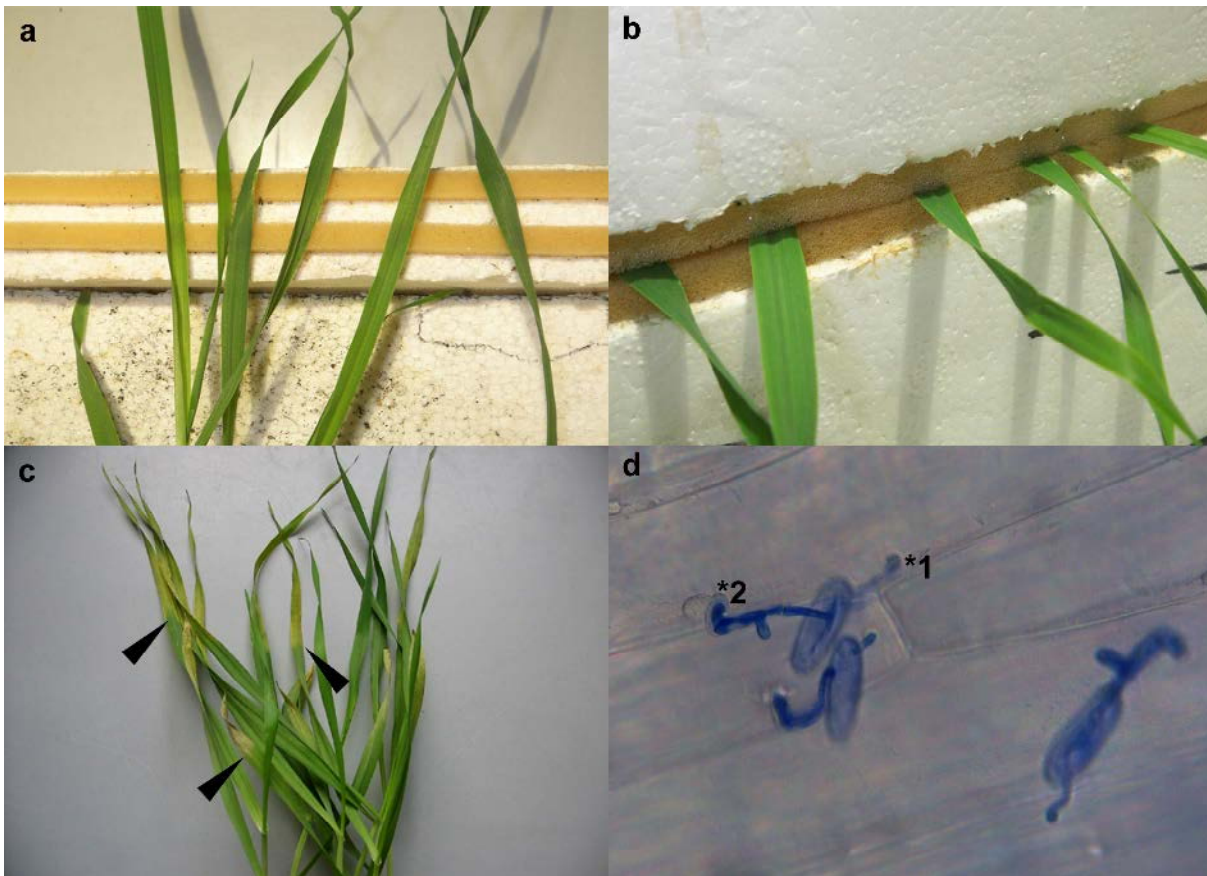
### 2.2 Aphidenzucht

Die verwendeten Blattläuse (*Rhopalosiphum padi*, *R.padi*) wurden auf dem Gerstenkultivar Golden Promise oder Auriga unter  $60\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Dauerlicht (HRI-BT 400, Radium Lampenwerk, Wipperfürth) gezüchtet. Um möglichst große Blattläuse zu erhalten, die sich einfacher kauterisieren lassen, wurden die Blattlauskolonien ca. 1 Woche vor der Verwendung für die Blattlausstylektomie auf neue Gerstenpflanzen umgesetzt. Dies reduzierte außerdem die Anzahl von Exuvien auf den Pflanzen, die aufgrund von möglichen Verunreinigungen nicht in die Sammelkäfige (siehe 2.5) eingebracht werden sollten.

### 2.3 Inokulation mit *Blumeria graminis*

Für die Inokulation der Versuchspflanzen wurden Konidiosporen des echten Gerstenmehltaupilzes *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* der Rasse A6 verwendet. Dieser wurde vom Institut für Phytopathologie und Angewandte Zoologie der JLU Gießen (AG Kogel) zur Verfügung gestellt. Die Anzucht des Mehltaupilzes erfolgte in einem Klimaschrank (Inculight 400, Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen) bei 18°C mit einer Lichtphase von 16h und einer relativen Luftfeuchte von 60%-65% auf dem anfälligen Gerstenkultivar Golden Promise. Nach einer Inokulation der 7-10 Tage alten Pflanzen konnten die Konidiosporen nach ca. einer Woche zur Inokulation der Versuchspflanzen verwendet werden. Die Sporen wurden dazu gleichmäßig über den Versuchspflanzen abgeschüttelt. Für die Kontrolle stand ein weiterer Klimaschrank mit identischen Bedingungen zur Verfügung. Zur Bestimmung von systemischen Effekten im Phloem der Gerste wurden die Mehltausporen nur auf definierte Bereiche der Versuchspflanzen inokuliert. Dazu wurden nur die Blattspitzen der 2., 3. und 4. Blätter oder ausschließlich

das 2. Blatt inokuliert, während die restlichen Pflanzen in einer geschlossenen Styroporbox verblieben. Ein sporendichter Übergang zur Außenseite wurde mit einer doppelten Schaumstoffdichtung realisiert (Abb. 2.1 a, b). Nach der Behandlung konnten an den Blättern keine Druck- oder Knickstellen festgestellt werden. Die inokulierten Versuchspflanzen verblieben 2-3h (Bildung des primären Keimschlauches) in den Inokulationsboxen.



**Abb. 2.1** a) Doppelte Schaumstoffdichtung der Inokulationsbox für eine ausschließliche Inokulation der Blattspitzen b) Übergang der Blattspitzen zur Außenseite der Inokulationsbox c) Überprüfung der Effektivität der Schaumstoffdichtung nach einer Inokulation der Blattspitzen. Zu erkennen ist die Ausbildung des Mycels am Übergang zur Außenseite (Pfeile) der Inokulationsbox. d) Anfärbung der Mehltausporen zur Bestimmung der Inokulationsdichte. (\*1 primärer Keimschlauch, \*2 sekundärer Keimschlauch mit Appressorium)

Vor der Entnahme der Pflanzen aus der Inokulationsbox wurde einer Infektion der restlichen Teile der Pflanzen durch ein Abpusten (Abzug) der überschüssigen Sporen entgegengewirkt. Zusätzlich wurde die Effektivität der Schaumstoffdichtung überprüft, indem stichprobenartig einige Versuchspflanzen bis zur deutlichen Ausbildung des Mycels aufbewahrt wurden. Hierbei konnte an den Pflanzenteilen, die während der Inokulation durch die Box geschützt waren, keine Mycelbildung festgestellt werden (Abb. 2.1 c). Ebenfalls stichprobenartig wurde die Inokulationsdichte ausgewertet. Dazu erfolgte eine

Färbung der Sporen nach Bildung des primären und sekundären Keimschlauches (Abb. 2.1 d).

## **2.4 Anfärbung der Mehltausporen zur Bestimmung der Inokulationsdichte**

Um die Inokulationsdichte zu bestimmen, wurden 2-3 Blätter aus einem Versuchsansatz 1-2 Tage entfärbt und anschließend 5min in essigsaurer Tinte gefärbt (Abb. 2.1 d). Anschließend wurde die Sporendichte mit Hilfe eines Leica DM LB2 Mikroskops (Leica Mikrosysteme, Wetzlar) auf einer Fläche von  $1\text{mm}^2$  ausgezählt. Die Inokulationsdichte betrug dabei zwischen 50 und 80 Mehltausporen/ $\text{mm}^2$ .

### Entfärbelösung:

150mg Trichloressigsäure (Merck KGaA, Darmstadt)  
75ml Ethanol (Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe)  
25 ml Chloroform (Roth)

### Färbelösung:

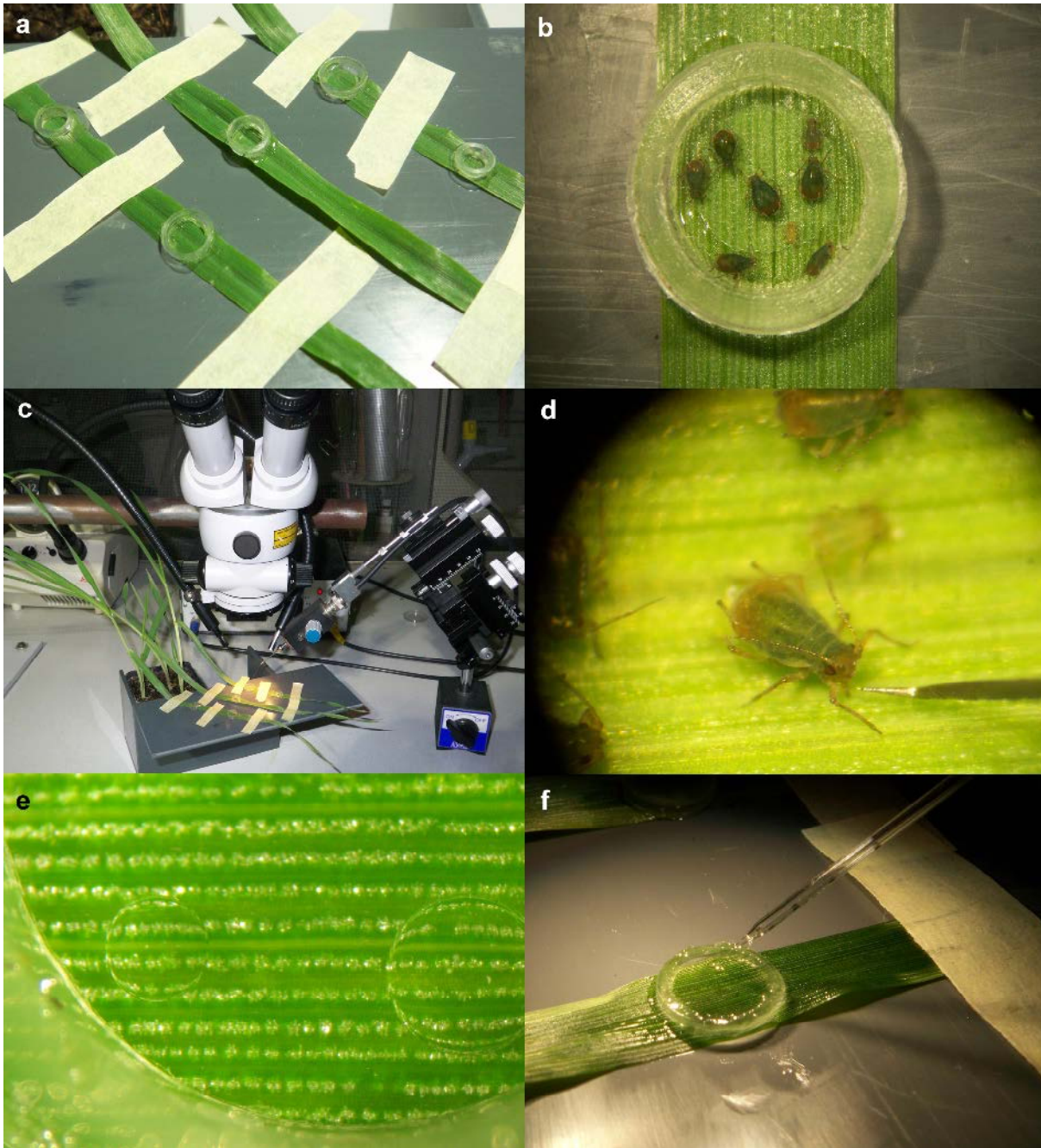
10ml Blaue Tinte (Pelikan 4001)  
90ml Essigsäure 20 % (Merck)

## **2.5 Stylektomie**

Als Stylektomie bezeichnet man die Probensammlung aus abgetrennten Mundwerkzeugen von phloemsaugenden Insekten. Zur Vorbereitung für die Probenentnahme aus dem Gerstenphloem wurde das 2. Blatt der Versuchspflanzen mit Klebeband vorsichtig auf individuell angefertigte Kunststoffhalterungen (Abb. 2.2 a, c) befestigt. Diese ermöglichen eine 360° Drehung unter dem Binokular. Damit waren die Mundwerkzeuge, unabhängig von der Ausrichtung der Blattläuse, von allen Seiten zugänglich. Um ein Sammeln der Probe unter Öl zu ermöglichen, wurden Sammelkäfige (Plastikringe mit einem Durchmesser von 0.5cm bis 1,0cm und einer Höhe von 1,6mm, Abb. 2.2 a, b) mit einem lösungsmittelfreien Klebstoff (Henkel) auf die Versuchspflanzen geklebt und zusätzlich von außen mit dem Kleber abgedichtet. Die Blattläuse (*R.padi*) wurden mit Hilfe eines weichen Pinsels von den Pflanzen gesammelt, in die Sammelkäfige gesetzt und diese mit einem Plexiglasplättchen verschlossen. Um eine sichere Nahrungsaufnahme der Aphiden aus dem Phloem zu gewährleisten, verblieben die Blattläuse ü.N. auf den Versuchspflanzen. Am nächsten Tag wurden die Mundwerkzeuge der Blattläuse mit Hilfe eines Binokulars (20-40fache Vergrößerung) und einem Mikrokauterisierungsgerät CA-50 (Syntech, Hilversum, Niederlande) durchtrennt. Dabei wird mit Hilfe eines Mikromanipulators die Wolframspitze (Brady 1965) des Mikrokauterisierungsgerätes an das Labium der Blattlaus



geführt (Abb. 2.2 d) und sofort nach Kontakt ein elektromagnetischer Impuls von 0,2 Sekunden ausgelöst. Durch den resultierenden Hitzereiz am Übergang zu den Mundwerkzeugen wird das Blattlausstilet (Mandibeln und Maxillen) durchtrennt.



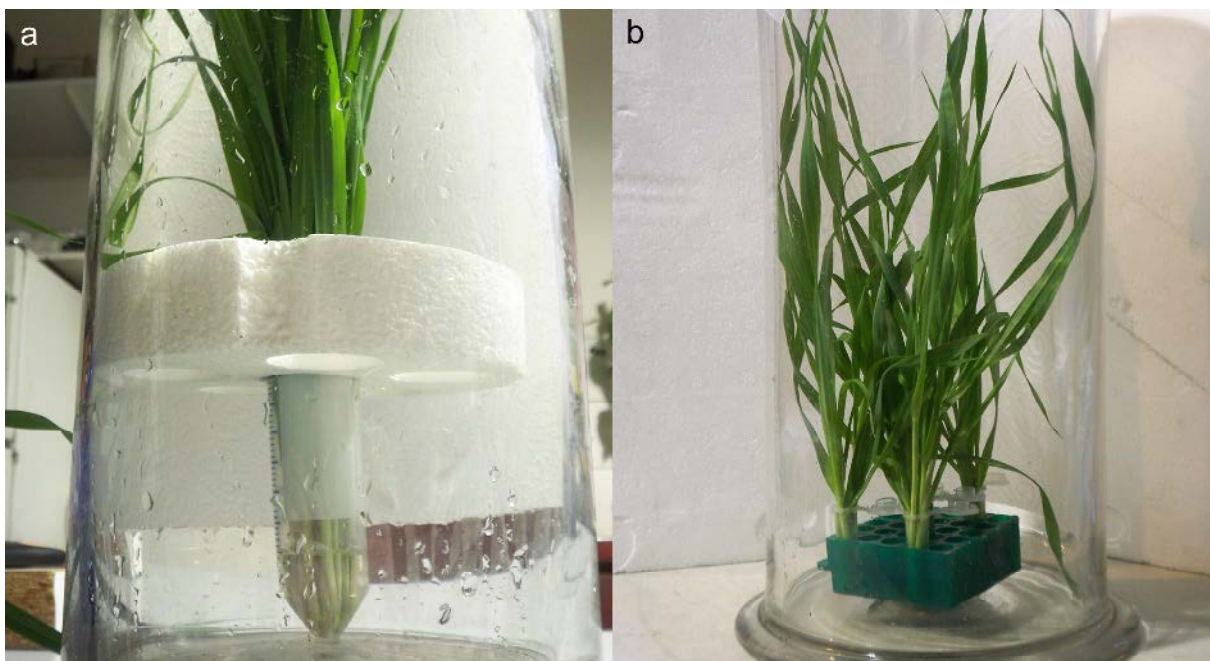
**Abb. 2.2 a) Montage der Blätter und Blattlauskäfige b) Blattläuse im Sammelkäfig c) Übersicht Stylektomie Arbeitsplatz d) Wolframspitze des Mikrokauterisierungsgerätes e) Exsudierende Blattlausstylette f) Absaugen der Probe mittels Mikrokapillare**

Im Idealfall zieht die Blattlaus das meist nicht vollständig durchtrennte Labium über das in der Pflanze bzw. im Siebelement verbleibende Stilet zurück und es kommt zu keiner Verunreinigung der Probe durch Hämolymphe. Nach dem Abtrennen der Stilette wurden die Blattläuse entfernt und der Sammelkäfig mit Silikonöl M200 (Roth) gefüllt. Ein zügiges

Arbeiten verhindert hierbei den frühzeitigen Verschluss der Stilette durch den Siebröhrensaft, der unter Luftkontakt koaguliert. Der austretende Siebröhrensaft bildete in den nächsten Stunden eine gut sichtbare Blase unter dem Silikonöl (Abb. 2.2 e), die mit Hilfe eines weiteren Mikromanipulators und einer Absaugvorrichtung (10ml Einwegspritze) mit einer Glaskapillare (Abb. 2.2 f) abgesaugt wurde.

## 2.6 Erleichterte Exsudation mit EDTA

Während der erleichterten Exsudation mit EDTA verhindert der  $\text{Ca}^{2+}$ -Komplexbildner EDTA den calciumabhängigen Wundverschluss der Siebelemente (King und Zeevaart 1974). Die Gerstenpflanzen wurden mit Hilfe einer Schere 1cm über der Erde abgeschnitten, das seneszente 1. Blatt entfernt und sofort mit der Schnittfläche in ein 1l Becherglas mit 1000ml 5mM EDTA pH7,3 (KOH) überführt und mit Hilfe einer Rasierklinge unter der EDTA-Lösung in einer Länge von 2cm erneut abgeschnitten. Anschließend wurden die Pflanzen in einem 1l Becherglas mit 100ml 2,5mM EDTA-Lösung pH 7,3 (KOH) zwischengelagert, bis alle Pflanzen auf diese Weise verarbeitet waren. Zusätzlich wurden die verwendeten Frischgewichte der unbehandelten und der behandelten Pflanzen auf den gleichen Wert eingestellt.



**Abb. 2.3 a) Erleichterte Exsudation mit EDTA in wasserdampfgesättigter Atmosphäre (Glaszylinder) für die Probengewinnung zur zweidimensionalen Proteinauftrennung. b) Probenentnahme für die SDS-PAGE und Zuckeranalysen**

Für eine zweidimensionale Proteintrennung mit anschließender Silberfärbung wurden ca. 60 Pflanzen verwendet. Nach der Vorbereitung wurden die Pflanzen auf drei 50ml Falcontubes mit je 8ml 2,5mM EDTA-Lösung pH 7,3 (KOH) verteilt. Die Exsudation wurde in wasserdampfgesättigten Glaszylindern (Abb. 2.3), die luftdicht mit Parafilm verschlossen wurden, über einen Zeitraum von 6h durchgeführt. Nach der Exsudation wurde die verbleibende EDTA-Lösung vereinigt und mit Hilfe eines Sterilfilters (Rotilabo, 0,45µm PVDF, Roth) in 20ml Falcontubes bis zur weiteren Verwendung bei -40°C eingefroren. Trotz einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre während der Exsudation reduzierte sich das eingesetzte Exsudationsmedium von 24ml auf ca. 16ml-20ml. Für die Probengewinnung der SDS-PAGE und Zuckeranalysen wurden 2ml Eppendorf Reaktionsgefäße mit je 1ml EDTA-Lösung verwendet (Abb. 2.3 b)

## **2.7 Probenaufbereitung der Proteine aus Exsudationsmedien**

Um ein geeignetes Probenvolumen für die Proteinfällung zu erreichen, wurde das Exsudationsmedium in Vivaspin®2-Filtereinheiten (Sartorius GmbH, Göttingen) mit einer Porenausschlussgröße von 3KDa in einer Kühlzentrifuge 5810R (Eppendorf AG, Hamburg) bei 8°C auf 100µl-200µl eingengt, mit 1ml Millipore H<sub>2</sub>O gewaschen und erneut auf 100µl-200µl eingengt. Eine Vorbehandlung der Filtermembran mit 5% Tween-20 nach Herstellerangabe wirkte sich günstig auf einen schnellen Durchfluss und auf eine reduzierte Bindung von Proteinen an die Membran aus. Trotzdem betrug die Einengungszeit des Exsudationsmediums mindestens 10h. Anschließend erfolgte eine Chloroform-Methanol-Fällung der Proteine nach Wessel und Flügge (1984). Das erhaltene Proteinpellet wurde ca. 3min in einem Rotations-Vakuum-Konzentrator RVC 2-25 (Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode) getrocknet.

## **2.8 Proteinextraktion aus Gerste**

Die Proteinextraktion aus Blattmaterial erfolgte leicht modifiziert nach Rampitsch et al. 2006. Für die Extraktion wurden ca. 400mg Blattmaterial im Mörser (vorgekühlt) mit flüssigem Stickstoff und wenig Sand fein zerrieben, davon ca. 200mg in ein 2ml Eppendorf Reaktionsgefäß mit 1ml Aceton, 10% TCA (w/v), 0,07% DTT (w/v) überführt, gevortext und ü.N. bei -18°C gelagert. Am nächsten Tag wurde das Pellet bis zur Farblosigkeit (5-7mal) in jeweils 1ml Aceton, 0,07% DTT (w/v) gewaschen und 10min mit 20000g bei 4°C (Micro22R, Hettich) pelletiert. Überschüssiges Aceton wurde verworfen und das Pellet im Rotations-Vakuum-Konzentrator RVC 2-25 getrocknet. Nach Zugabe von 500µl IEF-Puffer (ohne Bromphenolblau, siehe 2.8) und nachdem 2h geschüttelt wurde (IKA-Vibrax VXR,



Janke & Kunkel) konnten die Zelltrümmer bei 20000g/30min pelletiert werden und der Überstand mit den gelösten Proteinen abgenommen werden. Die Gesamtproteinbestimmung erfolgte nach Anleitung mit Hilfe des 2D-Quant-Kit® (GE Healthcare GmbH, München) mit einem SmartSpec® Plus-Photometer (Biorad, Hercules, USA).

## **2.9 SDS-PAGE**

Für eine Trennung der Proteine, die mit Hilfe der Stylektomiemethode gewonnen wurden, konnte das geringe Probenvolumen ohne weitere Aufbereitung mit der gleichen Menge Probenpuffer Roti-Load1® (Roth) vermischt werden. Für die Auftrennung der Proteine aus der erleichterten Exsudation mit EDTA wurde entweder das Pellet der Chloroform-Methanol-Fällung oder ein geeignet geringes Volumen des eingeeengten Exsudationsmediums mit Probenpuffer vermischt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte nach Laemmli (1970) in einem Biorad MiniProtean® System.

### 12,5% Trenngel:

4,2ml 29:1 Acrylamid/Bisacrylamid (Roth)  
3,195ml Millipore H<sub>2</sub>O  
2,5ml 1,5M 4x Tris-Gelpuffer pH8,8 (HCl) 0,4%(w/v) SDS  
80µl APS 10% (w/v)  
8µl TEMED (Roth)

### 4% Sammelgel:

1,33ml 29:1 Acrylamid/Bisacrylamid (Roth)  
6,06ml Millipore H<sub>2</sub>O  
2,5ml 0,5M 4x Tris-Gelpuffer pH6,8 (HCl) 0,4%(w/v) SDS  
80µl APS 10% (w/v)  
8µl TEMED

### 10x Laufpuffer:

0,25M Tris  
1,92M Glycin  
1% SDS

## **2.10 Isoelektrische Fokussierung**

Für die zweidimensionale Auftrennung der Proteine wurde das unter 2.7 bzw. 2.8 erhaltene Proteinpellet in 130µl IEF-Puffer nach Méchin et al. (2003) aufgenommen und 2-4h mit Hilfe eines Schüttlers (IKA GmbH & CO KG, Staufen) geschüttelt und vor der Rehydrierung der IPG-Gele (Biorad, pH5-8, 7cm) kurz anzentrifugiert.

IEF-Puffer nach Méchin et al. (2003):

2% CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl) Dimethylammonio]-1-Propansulfonat), (Roth)  
2% SB 3-10 (N-Decyl-N,N-Dimethyl-3-Ammonio-1-Propan-Sulfonat), (Sigma-Aldrich)  
20mM DTT (Dithiothreitol), (Roth)  
5mM TCEP (Tris (2-Carboxyethyl) Phosphin Hydrochlorid), (Sigma-Aldrich)  
0,5% (v/v) Ampholyte pH4-6 (Biorad)  
0,25% (v/v) Ampholyte pH3-10 (Sigma-Aldrich)  
5M Harnstoff  
2M Thioharnstoff  
Bromphenolblau (nach Bedarf)

Die Rehydrierung der IPG-Gele erfolgte ü.N. unter Parafinöl. Am nächsten Tag wurden die Proteine nach folgendem Programm fokussiert.

IEF-Programm:

250V 20min  
500V 90min  
1000V linear 20min  
1000V 60min  
3000V 12000V/h

Nach der IEF der Proteine wurde das Parafinöl mit Millipore H<sub>2</sub>O vom IPG-Gel gewaschen und das IPG-Gel je 10min in Equilibrierungspuffer A und Equilibrierungspuffer B geschwenkt.

Equilibrierungspuffer:

50mM Tris, pH8,8 (HCl)  
4% (w/v) SDS  
20% (v/v) Glycerin  
Bromphenolblau bis zur gewünschten Färbung

+50mg DTT/5ml Equilibrierungspuffer vor Verwendung zusetzen, ergibt Equilibrierungspuffer A

+63mg IAA/5ml Equilibrierungspuffer vor Verwendung zusetzen, ergibt Equilibrierungspuffer B

Die Gelstreifen wurden nun mit 1x Laufpuffer gewaschen, vorsichtig getrocknet, zwischen die Glasplatten des mit Trenngel vorbereiteten Trennsystems montiert und mit der Sammelgellösung luftblasenfrei eingegossen. Durch eine erhöhte TEMED Menge von 3,6µl/1,8ml Sammelgellösung polymerisierte das Sammelgel in wenigen Minuten aus. Als Marker diente 0,25µl des Proteinstandards (Biorad, Precision-Plus<sup>®</sup>) der zuvor auf ein 2mmx5mm großes Filterpapier pipettiert und getrocknet wurde. Der Proteinstandard wurde in die noch flüssige Sammelgellösung an der sauren Seite des IPG-Gels (pH5) platziert.



Nach dem Auffüllen der Gelkammer mit 1x Laufpuffer wurden die Proteine bis zum Auslaufen der Laufmittelfront mit konstant 16mA/Gel getrennt.

## 2.11 Färbung der Proteingele

Die Färbung der Gele erfolgte entweder nach einem durch Dr. Martin Guttenberger modifizierten Protokoll (persönliche Mitteilung) einer Silberfärbung nach Poehling und Neuhoﬀ (1981) oder mit Hilfe des massenspektrometriekompatiblen Fluoreszenzfarbstoﬀes Flamingo<sup>®</sup> Protein Stain (Biorad). Alle Schritte wurden auf einem Schüttler (Polymax 1040, Heidolph) durchgeführt.

### Silberfärbung nach Poehling und Neuhoﬀ (modifiziert):

- Fixieren in 50% Methanol, 10% Essigsäure 30min
- Waschen in 5% Methanol, 7% Essigsäure 30min
- Waschen in Millipore H<sub>2</sub>O 1min
- Fixieren in 7,1% Glutaraldehyd 1h
- Waschen in 5% Methanol, 7% Essigsäure ü.N.
- Waschen in Millipore H<sub>2</sub>O 3x5min
- Färben in Lösung A 1h
- Waschen in Millipore H<sub>2</sub>O 3x5min
- Entwickeln in Lösung B nach Bedarf
- Stoppen in Millipore H<sub>2</sub>O

### Lösung A:

7,6ml NaOH 1%  
13,4ml Millipore H<sub>2</sub>O  
1,4ml NH<sub>3</sub> (25%)  
1,6ml AgNO<sub>3</sub> 20% (w/v) tropfenweise zugeben  
Auf 100ml auffüllen

### Lösung B:

80ml H<sub>2</sub>O  
100µl Zitronensäure 1% (w/v)  
5µl Formaldehyd (37%)

### Fluoreszenzfärbung:

- Fixieren in 40% Ethanol (v/v), 10% Essigsäure (v/v) 3h
- Färben in 50ml 10% (v/v) Flamingo Protein Stain (Biorad) ü.N.
- Waschen in Millipore H<sub>2</sub>O 30sec

## 2.12 Auswertung der Proteingele

Die Dokumentation der Silber gefärbten Gele erfolgte mit einem Gel-DocXR<sup>®</sup>-System (Biorad) unter Weißlicht. Für die Dokumentation der mit Fluoreszenzfarbstoff gefärbten Gele, wurde ebenfalls mit dem Gel-DocXR-System, eine 280nm UV-Licht Anregung und ein 590nm Bandpass-Filter verwendet. Die digitalisierten eindimensionalen Proteingele wurden mit der Analyse Software QuantityOne<sup>®</sup> (Biorad) ausgewertet. Für die Auswertung der zweidimensionalen Proteingele stand die Software PDQuest-Basic<sup>®</sup> (Biorad) zur Verfügung.

## 2.13 Zuckeranalyse mit Hilfe von *High Performance Liquid Chromatographie* (HPLC)

Stylektomieproben konnten ohne weitere Behandlung in 600µl Millipore H<sub>2</sub>O aufgenommen werden. Durch die hohe Empfindlichkeit der Messung konnte ab einer Probenmenge von ca. 0,3µl Siebröhrensaft eine Bestimmung der Zucker durchgeführt werden. Die Vorbereitung der Pflanzen für eine Analyse der Zucker im Exsudationsmedium erfolgte wie unter 2.6 beschrieben. Abweichend davon wurden jedoch nur 1-3 Gerstenpflanzen (21d) in 1ml Exsudationsmedium pro Messung verwendet. Nach der erleichterten Exsudation mit EDTA wurde das Exsudat mit 25mg Polyclar (Serva, Heidelberg) gekocht (10min) und auf Eis abgekühlt. Anschließend erfolgte eine 10min Zentrifugation bei 1000g (Mikro22R, Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen). 0,6ml des Überstandes wurden für die HPLC-Analyse abpipettiert. Die Trennung der Proben erfolgte in einer CarboPac<sup>®</sup> PA20 Säule (250mm Länge, 3mm Durchmesser) im HPLC DX 500 System (Dionex, Sunnyvale, USA). Als Zuckerstandard diente eine Lösung aus je 10mg/l Myoinositol, D(+)-Trehalose, D(+)-Glucose, D(-)-Fructose, D(+)-Saccharose, (D+)-Melzitose-Monohydrat, D(+)-Raffinose-Pentahydrat und Stachyose-Trihydrat (Fluka GmbH, Buchs, Schweiz).

## 2.14 Analyse und Identifizierung von Proteinspots

Aufgrund der geringen Proteinmengen wurde für die präparativen Gele das Exsudationsmedium aus ca. 120 Pflanzen verwendet. Diese Gele wurden mit dem massenspektrometrikompatiblen Fluoreszenzfarbstoff Flamingo Protein Stain wie unter 2.11 beschrieben gefärbt. Die ausgestanzten Proteinspots wurden am Institut für medizinische Biochemie der Justus-Liebig-Universität Gießen identifiziert. Dort erfolgten 3 x 15 min. Waschschrte in 100µl 50mM Ammoniumhydrogencarbonatlösung mit einem 50% Acetonitril Volumenanteil mit einer anschließenden Vakuumtrocknung. Der Verdau der Proteine erfolgte ü.N. in 50µl 25mM Ammoniumhydrogencarbonat Lösung mit 0,5µg

Trypsin (Promega, Mannheim). Das Gelmaterial wurden anschließend in 10µl 0,1% Trifluoressigsäure aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight*) Massenspektrometrie erfolgte an einem Ultraflex®I Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Bremen). Die Identifizierung der Proteine erfolgte mittels MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) mit Hilfe der NCBI Nr Datenbank.

### **2.15 Methyljasmonatbehandlung**

Die Behandlung der Gerstenpflanzen mit Methyljasmonat erfolgte durch Besprühen aller Blätter mit 100µM Methyljasmonatlösung (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen) mit einem Anteil von 0,1% (v/v) Tween-20 für eine bessere Benetzung der Blätter. Die Kontrolle wurde mit der entsprechenden Tween-20 Lösung ohne Methyljasmonat behandelt.

### **2.16 DCINA-Behandlung**

Wegen der schlechten Löslichkeit in Wasser wurden 100mg DCINA (2,6-Dichlorisonikotinsäure (Sigma-Aldrich) in 1ml Dimethylformamid vorgelöst und anschließend mit 500ml Leitungswasser aufgefüllt. Für eine Konzentration von 10ppm in der Anzuchterde wurden die Gerstenpflanzen in 300ml Anzuchttöpfen mit 15ml der Lösung gegossen. Die Kontrollpflanzen wurde mit der entsprechenden Dimethylformamidlösung ohne DCINA behandelt.

### **2.17 Bestimmung der Peroxidaseaktivität von Stylektomieproben**

Zur Bestimmung der Peroxidaseaktivität im Siebröhrensaft der Gerste wurde jeweils 1µl einer Stylektomieprobe auf eine Cellulosenitrat E Membran (Schleicher & Schüll GmbH, Dassel) aufgetragen. Als Positivkontrolle diente 0,25µl verdünnte Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP). Nach dem Auftragen der Proben wurde die Membran in einer Lösung aus 50mM Tris-HCl (pH8), 10mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10mM Ni (SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 0,02% 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (frisch zusetzten) und 0,25% DAB (frisch zusetzten) unter leichter Bewegung inkubiert. Das DAB (Diaminobenzidin) polymerisiert in der Anwesenheit von Peroxidase zu einem schwarzen Niederschlag. Nach ca. 3min Entwicklungszeit erfolgte die Dokumentation, mit Hilfe des Gel-DocXR-Systems, unter Weißlicht.

### **2.18 Bestimmung des Zellwandanteils nach Befall mit *Bgh***

Mit Hilfe der Bestimmung des Zellwandanteils im Verhältnis zur eingesetzten Frischmasse sollten systemische Effekte im Zusammenhang mit Zellwandverstärkungen zur

Pathogenabwehr nachgewiesen werden. Dabei wurde ausschließlich das 2. Blatt der Gerstenpflanzen, wie unter 2.3 beschrieben, inokuliert. 48h nach Befall mit *Bgh* wurden aus dem 2., 3. und 4. Blatt der Pflanzen definierte Blattstückchen aus der Mitte der jeweiligen Blätter geschnitten, in Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und das Gewicht mit Hilfe einer Feinwaage bestimmt. Das Leergewicht der Eppendorf-Reaktionsgefäße (RG) wurde ebenfalls bestimmt. Nach der Zugabe von 1,5ml 80% Ethanol wurden die Blattstückchen für 5min auf ca. 80°C erhitzt und ü.N. bei 70°C getrocknet. Am nächsten Tag wurde die Trockenmasse der einzelnen Blattstückchen bestimmt. Der Anteil der Zellwand wurde nach folgender Formel bestimmt.

$$\text{Zellwandanteil (\%)} = \frac{(\text{Trockenmasse} + \text{Leergewicht RG}) - \text{Leergewicht RG}}{(\text{Frischmasse} + \text{Leergewicht RG}) - \text{Leergewicht RG}}$$

## 2.19 HPLC der löslichen Phenolsäuren

Die Behandlung des Gerstenkultivars Pallas *mlo5* mit Mehltausporen erfolgte wie unter 2.3 beschrieben. 48h nach Inokulation des 2. Blattes wurden jeweils die 2., 3. und 4. Blätter der befallenen Pflanzen sowie die entsprechenden Blätter der Kontrolle geerntet und sofort in flüssigem Stickstoff bis zur Verwendung gefroren. Nach einer Trocknung der Blätter in einer Gefriertrocknungsanlage (Alpha 1-4, Christ) wurde das Gewicht der Proben bestimmt. Anschließend wurden die Proben 5min in einem *TissueLyser* (Qiagen, Hilden) mit 30 Bewegungen/s zerkleinert. Die Extraktion der Phenolsäuren erfolgte mit 80% Methanol und jeweils 1ml Volumen nach Eynck et al. (2009). Nach Vereinigung der Überstände erfolgte eine Zentrifugation zur Sedimentierung restlicher Zelltrümmer. Aus den Überständen wurde je 1ml zur weiteren Verarbeitung abpipettiert und mit einem Standard (20µg Gallussäure) vermischt. Je 10µl wurden anschließend in einem HPLC-System (Merck) analysiert. Die Trennung der Proben erfolgte in einer CC250-4 Nucleodur Sphinx RP 250 Säule mit 4mm Länge und 5µm Porengröße (Machery & Nagel, Düren). Als Elutionsmittel wurden 4,5% (v/v) Ameisensäure (Merck) und Acetonitril (Roth) in folgender Abfolge verwendet.

0-19min	95% Ameisensäure
20-29min	5% Acetonitril
30-49min	75% Ameisensäure / 25% Acetonitril
50min	2% Ameisensäure / 98% Acetonitril

Mit Hilfe des Gallussäurestandards erfolgte die Umrechnung der Daten aus den einzelnen Retentionszeiten in µg/ml Methanol-Extrakt und die Verrechnung der eingesetzten Trockenmassen der einzelnen Proben.

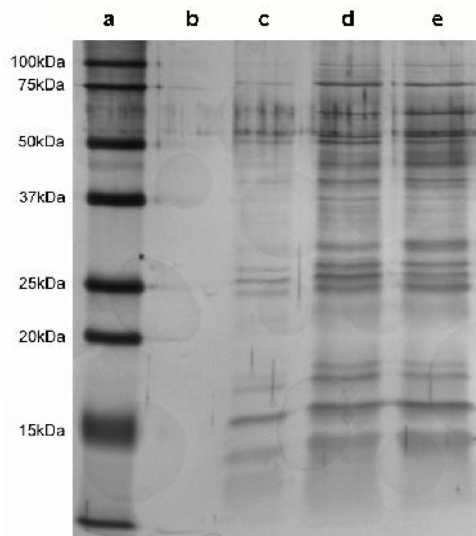
### 3. Ergebnisse

#### **3.1 Vergleich und Optimierung der phloemspezifischen Probenentnahme aus Gerste**

Im methodischen Teil der Arbeit (3.1) wurde zunächst die phloemspezifische Probenentnahme aus Gerste etabliert. Besonders die erleichterte Exsudation mit EDTA wurde in der Vergangenheit nur vereinzelt für vergleichende Proteingele verwendet. Neben der Probenentnahme mittels Aphidenstylektomie, die als Referenz für die Phloemspezifität anzusehen ist, sollte die einfache Anwendung der EDTA-Methode genutzt werden. Neben den Vorteilen der EDTA-Methode wurde auch der prinzipbedingte und kontrovers diskutierte Verunreinigungsgrad der EDTA-Methode im methodischen Teil der Arbeit untersucht. Des Weiteren wurde für beide Probenentnahmetechniken eine zweidimensionale Gelelektrophorese etabliert. Diese ermöglichte einen genauen Vergleich der EDTA- und Stylektomiemethode auf Proteinebene.

##### **3.1.1 SDS-PAGE von EDTA-Proben**

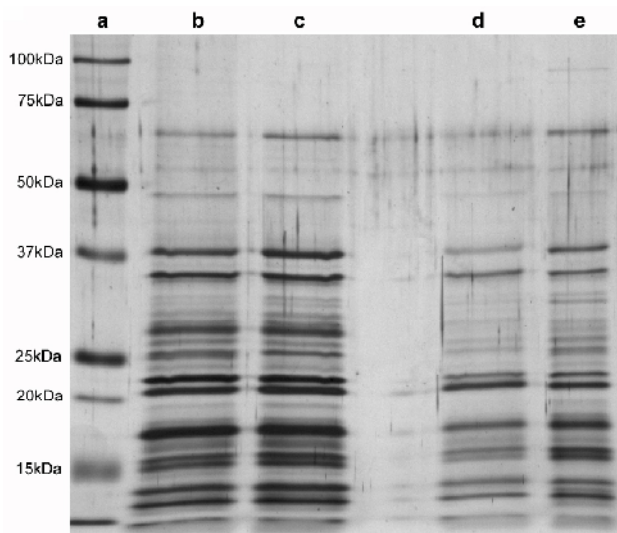
Zuerst wurde der Einfluss der EDTA-Konzentration im Exsudationsmedium untersucht. Im Originalprotokoll von King und Zeevaart (1974) wurde eine 20mM EDTA-Konzentration im Exsudationsmedium verwendet. Aufgrund von Literaturhinweisen über die membranschädigende Wirkung von EDTA (Girousse et al. 1991) war jedoch bei steigender EDTA-Konzentration mit einer erhöhten Kontaminierung von nicht-phloemspezifischen Proteinen zu rechnen, die z.B. aus der Plasmamembran der angeschnittenen Zellschichten freigesetzt werden können. In der Auftrennung der Proteine aus dem Exsudationsmedium konnte mit einer EDTA-Konzentration von 2,5mM und 5mM eine quantitativ sehr ähnliche Proteinmenge bei konstantem Bandenmuster erzielt werden (Abb. 3.1 d, e). Mit einer Konzentration von 0mM EDTA und der verwendeten Schnittfläche von 3 Gerstenpflanzen waren keine Proteine in der Auftrennung nachweisbar (Abb. 3.1 a). Für die folgenden Versuche wurde deswegen eine Konzentration von 2,5mM EDTA im Exsudationsmedium verwendet.



**Abb. 3.1: SDS-PAGE und Silberfärbung von EDTA-Proben mit unterschiedlichen EDTA-Konzentrationen im Exsudationsmedium.**  
a) Protein-Standard, b) 0mM EDTA, c) 1mM EDTA, d) 2,5mM EDTA, e) 5mM EDTA (jeweils pH 7,0)  
Jede Probe wurde aus 3 Pflanzen (14d) *Hv. cv. Pallas* mit einer Exsudationsdauer von 6h gewonnen.

### 3.1.2 SDS-PAGE von Stylektomieproben

Mit Hilfe der Blattlaus-Stylektomie wurden phloemspezifische Referenzproben für einen Vergleich mit EDTA-Proben gewonnen. Vereinzelt lieferten die abgetrennten Stilette der Aphiden über einen Zeitraum bis zu 3 Tagen Siebröhrensaft. In der Auftrennung dieser Proben (Abb. 3.2) lässt sich ein sehr konstantes Bandenmuster mit einer leichten Abnahme der Proteinkonzentration nach 24h feststellen. Aufgrund der Seltenheit einer entsprechend langen Exsudationsphase wurden jedoch keine Proben über einen Zeitraum von 24h hinaus nach Abtrennung der Stilette verwendet.

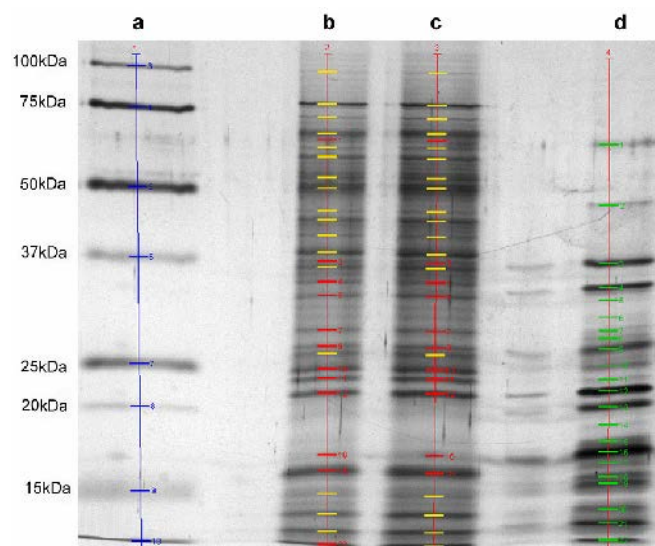


**Abb. 3.2: SDS-PAGE und Silberfärbung von Proteinen aus Stylektomieproben die zu unterschiedlichen Zeiträumen aus identischen Stiletten gewonnen wurden.** a) Protein-Standard b) 6µl Stylektomieprobe (Probenentnahme 0-6h nach Kauterisierung) c) 6µl Stylektomieprobe (Probenentnahme 6-24h nach Kauterisierung) d) 6µl Stylektomieprobe (Probenentnahme 24-48h nach Kauterisierung) e) 6µl Stylektomieprobe (Probenentnahme 48-72h nach Kauterisierung).



### 3.1.3 Vergleich der Proteintrennungen aus EDTA- und Stylektomieproben

Nach einer gemeinsamen SDS-PAGE von Proteinen aus EDTA- und Stylektomieproben wurden die Proteinbanden mit Hilfe des Programms QuantityOne zugeordnet (Abb. 3.3). Insbesondere im niedermolekularen Bereich zwischen 15-37kDa ergab sich eine gute Übereinstimmung zwischen EDTA- und Stylektomieprobe (Abb. 3.3 b, c, rote Markierung). Aufgrund der hohen Abweichung im Bereich zwischen 37kDa und 75kDa (Abb. 3.3 b, c, gelbe Markierung) und der großen Intensitätsunterschiede übereinstimmender Banden war jedoch ein Vergleich der Sammeltechniken mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese unverzichtbar. Diese ermöglicht außerdem das Ausstanzen einzelner Proteinspots zur massenspektrometrischen Analyse und Identifizierung der Proteine nach Mehltaubefall.



**Abb. 3.3: SDS-PAGE und Silberfärbung von Proteinen aus EDTA- (b, c, Doppelansatz) und Stylektomieproben. (d)**

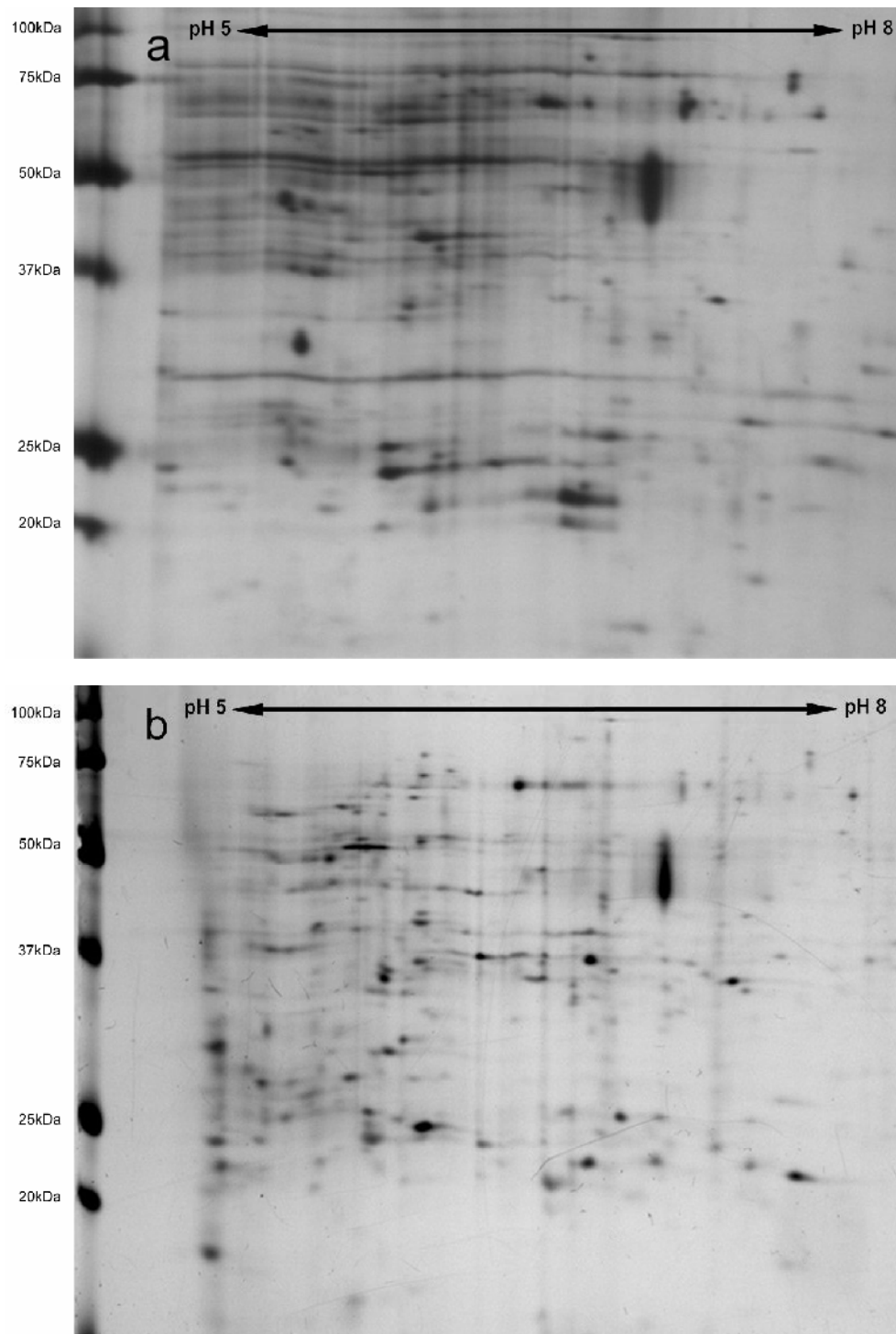
a) Protein-Standard b) EDTA-Probenentnahme aus 3 Pflanzen *Hv. cv. Pallas* (14d) 8h Exsudationsdauer c) EDTA-Probenentnahme aus 6 Pflanzen *Hv. cv. Pallas* (14d) 8h Exsudationsdauer d) 6µl Stylektomieprobe aus *Hv. cv. Pallas* (Probenentnahme 0-6h nach Kauterisierung; entspricht der Referenz-Lane (grün))

Identische Proteinbanden sind im Vergleich zur Referenz-Lane rot markiert. Abweichungen zur Referenz-Lane sind gelb markiert.

### 3.1.4 Zweidimensionale Auftrennung der Proteine aus EDTA-Proben

Mit Hilfe einer zweidimensionalen Auftrennung der Proteine aus den unterschiedlichen Sammeltechniken sollten genauere Erkenntnisse über die Phloemspezifität der EDTA-Probe gewonnen werden. Aufgrund fehlender Literaturangaben über die isoelektrische Fokussierung von EDTA-Proben wurde

zunächst ein Standard-IEF Puffer (7M Harnstoff, 2M Thioharnstoff, 25mM DDT, 4% CHAPS, 0,2% Ampholyte) verwendet.

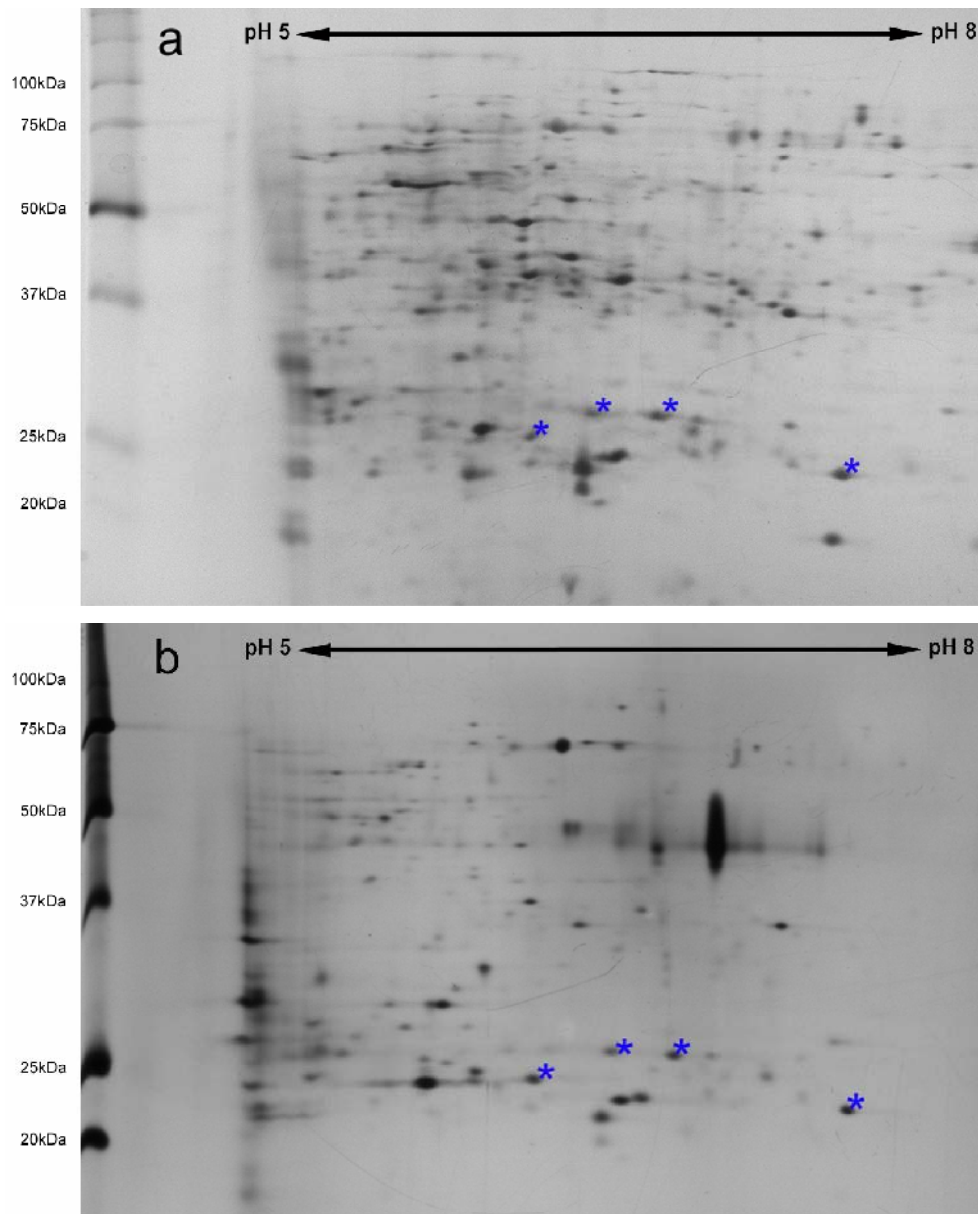


**Abb. 3.4:** Zweidimensionale Auftrennung und Silberfärbung von Proteinen aus EDTA-Proben mit identischer Probenaufbereitung und der anschließenden Auftrennung mit unterschiedlichen IEF-Puffern.

a) Standard IEF-Puffer (7M Harnstoff, 2M Thioharnstoff, 25mM DDT, 4% CHAPS, 0,2% Ampholyte) b) R2D2 IEF-Puffer nach Méchin et al. 2003



Die Auftrennungen zeigten jedoch eine starke vertikale und horizontale Streifenbildung, insbesondere im mittleren pH-Bereich der verwendeten IPG-Gele (Abb. 3.4 a). Mit der Verwendung des R2D2-IEF-Puffers nach Méchin et al. 2003 konnte die Auflösung im mittleren Bereich der Gele verbessert werden (Abb. 3.4 b). Der R2D2-IEF-Puffer beinhaltet die Kombination aus 2 reduzierenden Substanzen (DTT und TECEP) sowie die Verwendung von 2 Detergenzien (CHAPS und SB3-10).



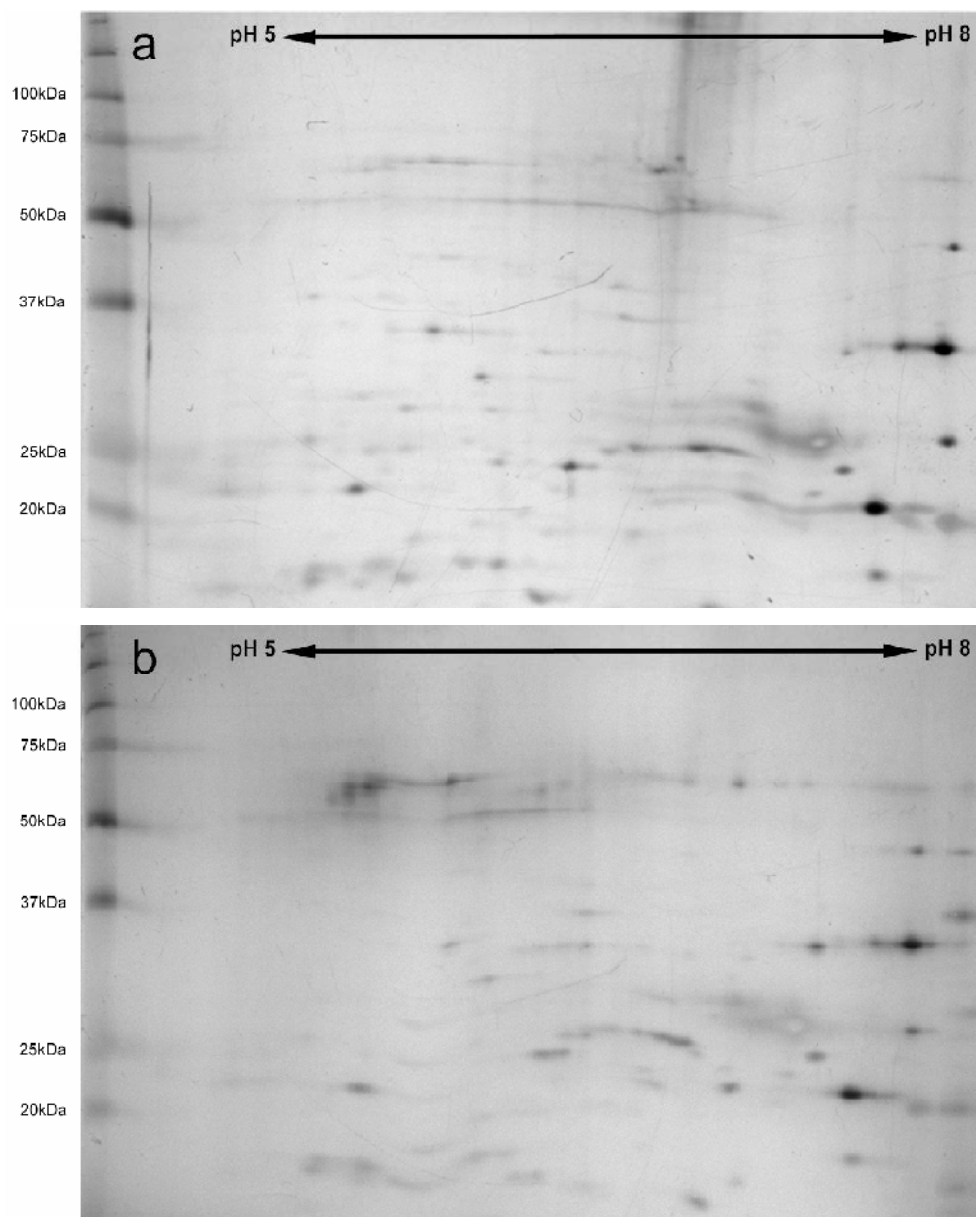
**Abb. 3.5:** Zweidimensionale Auftrennung und Silberfärbung von Proteinen aus EDTA-Proben (*Hv. cv. Pallas mlo5*) aus unterschiedlichen Versuchsansätzen. Trotz einer identischen Probenaufbereitung unterscheiden sich die Spotmuster erheblich während die potentiell phloemspezifischen Proteinspots (siehe 3.1.6, Abb. 3.7) eine stets ähnliche Intensität und Lokalisation (Beispiele siehe blaue Markierung) zeigen.

Anstatt der verbreiteten Acetonfällung wurde eine Chloroform/Methanol-Fällung nach Wessel und Flügge (1984) verwendet. Dies wirkte sich günstig auf die Löslichkeit des Proteinpellets im IEF-Puffer und auf eine Reduzierung der horizontalen Streifenbildung aus. Weitere Verbesserungen konnten mit einer Optimierung des Spannungsverlaufs während der Fokussierung erreicht werden.

Trotz der konstanten Aufzucht und Verarbeitung der Versuchspflanzen und einer identischen Probenaufbereitung für die IEF lassen sich in den Auftrennungsmustern der EDTA-Proben (Abb. 3.5) hohe Abweichungen erkennen. Nach einer späteren Identifizierung (siehe 3.1.6) der deckungsgleichen und damit potentiell phloemspezifischen Proteinspots aus EDTA- und Stylektomieproben stellte sich jedoch heraus, dass in den beiden Auftrennungen (Abb. 3.5) ein ähnlicher Anteil von phloemspezifischen Proteinen vorliegt.

### 3.1.5 Zweidimensionale Auftrennung der Proteine aus Stylektomieproben

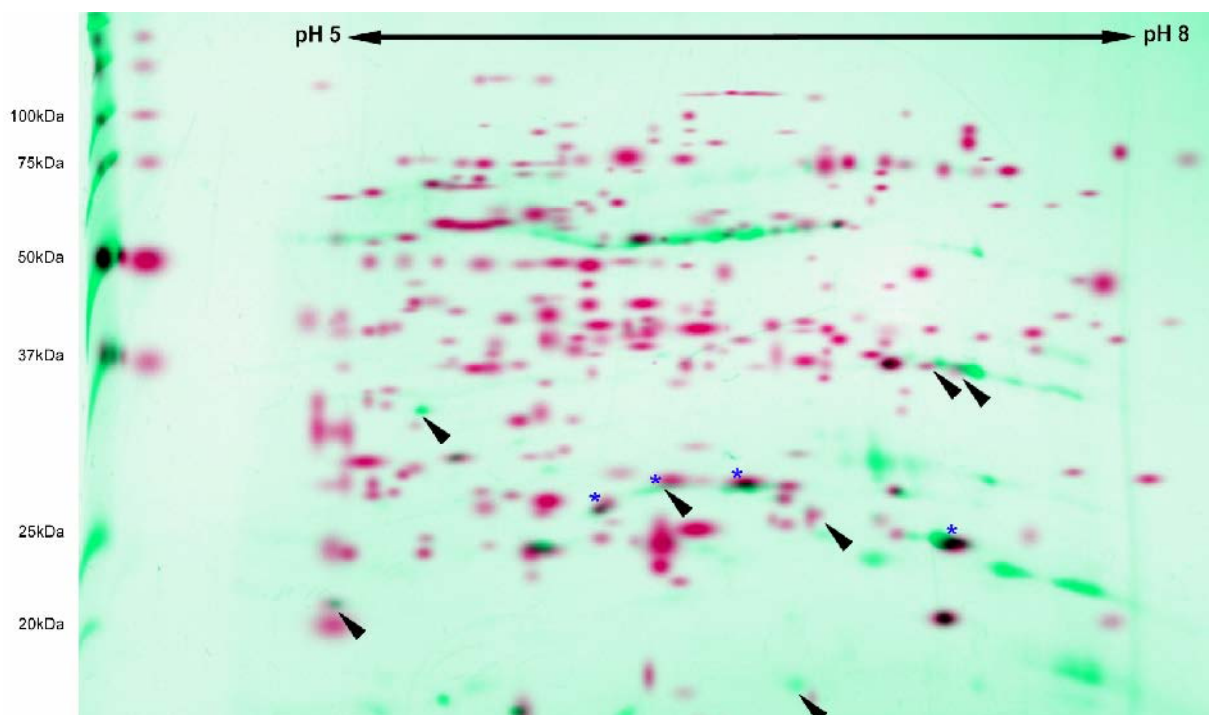
Mit Hilfe der Blattlaus-Stylektomie sollte eine Referenz-Probe zur Identifizierung der phloemspezifischen Proteine aus der EDTA-Methode gewonnen werden. Die Anzahl der Proteinspots reduzierte sich, bei vergleichbarer Intensität der phloemspezifischen Spots (siehe 3.1.6) aus der EDTA-Probe, erheblich. Im Gegensatz zur EDTA-Methode zeigten die Auftrennungsmuster der Stylektomieproben eine hohe Konstanz zwischen den verschiedenen Versuchsansätzen (Abb. 3.6). Mit einem Probenvolumen von 12µl Siebröhrensaft und einer Silberfärbung konnten bis zu 60 Proteine im Gel nachgewiesen werden.



**Abb. 3.6:** Zweidimensionale Auftrennung und Silberfärbung von Proteinen aus *Hv. cv. Pallas* (21d) die mit Hilfe der Stylektomiemethode gewonnen wurden. a) 12µl Siebröhrensaft b) 10µl Siebröhrensaft

### 3.1.6 Identifizierung von phloemspezifischen Proteinen

Mit Hilfe des Programms PD-Quest konnten die Gele aus den unterschiedlichen Sammeltechniken in Falschfarben dargestellt und überlagert werden. Dadurch ergab sich eine gute Übersicht der phloemspezifischen Proteinspots der EDTA-Probe. Bei exakter Überlagerung der Proteine aus EDTA- und Stylektomieproben werden die mit hoher Wahrscheinlichkeit identischen Proteine dunkel dargestellt (Abb. 3.7). Die Basisversion von PD-Quest erlaubt dabei keine Verzerrung der Gele, um die geringen Laufunterschiede der verschiedenen Gele auszugleichen. In Abb. 3.7 sind deshalb zusätzliche Markierungen (schwarze Pfeile) eingefügt, die mit hoher Wahrscheinlichkeit übereinstimmende Proteine darstellen. Im zweidimensionalen Vergleich der unterschiedlichen Sammeltechniken reduziert sich die Anzahl der potentiell phloemspezifischen Proteinssots in der EDTA-Probe erheblich. Eine höhere Anzahl deckungsgleicher Spots lässt sich eventuell durch ein höheres Probenvolumen der Stylektomieprobe erreichen.



**Abb. 3.7:** Falschfarbendarstellung und Überlagerung einer zweidimensionalen Auftrennung von Proteinen, die mit Hilfe der Stylektomiemethode (grün) und mit Hilfe der erleichterten Exsudation mit EDTA (rot) gewonnen wurden.

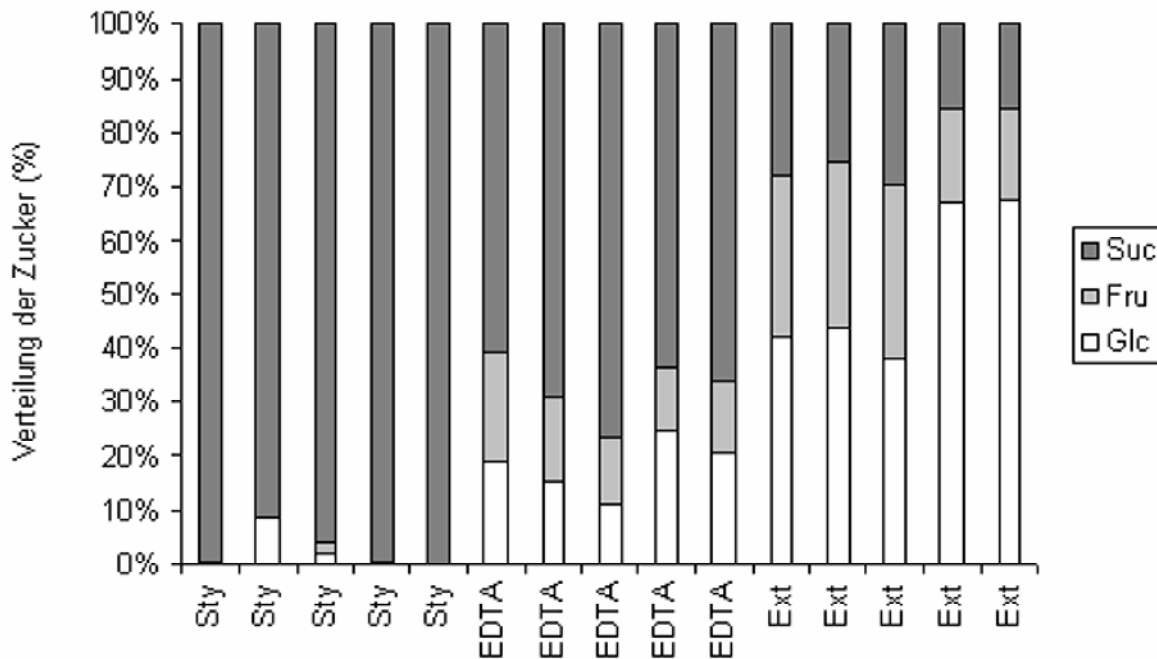
Deckungsgleiche Proteinspots (mit hoher Wahrscheinlichkeit identische Proteine) erscheinen dunkel. Zusätzlich sind wahrscheinlich übereinstimmende Proteinspots mit Pfeilen gekennzeichnet, die durch geringe Laufunterschiede der Gele nicht exakt deckungsgleich sind. Die blaue Markierung entspricht den in Abb. 3.5 als phloemspezifisch gekennzeichneten Spots.

### 3.1.7 Bestimmung der Phloemspezifität mittels PCR

Eine mögliche Kontaminierung durch nicht-phloemspezifische Proteine konnte außerdem mit der Verwendung der Stylektomieprobe als *Template* in einer PCR mit RUBISCO-spezifischen Primern (kleine Untereinheit) überprüft werden. Aufgrund der photosynthetisch inaktiven Siebelemente sollte sich kein PCR-Produkt aus Siebröhrensaft amplifizieren lassen. (Ruiz-Medrano et al. 1999, Giavalisco et al. 2006). Auch nach 60 Zyklen konnte kein RUBISCO spezifisches PCR-Produkt nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde der RNase-Gehalt der Stylektomieprobe überprüft. Dabei konnte keine RNase-Aktivität festgestellt werden, was ebenfalls auf die Reinheit bzw. Phloemspezifität hindeutet. (Sasaki et al. 1998, Doering-Saad et al. 2002). Mit diesem Kontrollexperiment konnte die Verwendung der Stylektomieprobe als phloemspezifische Referenzprobe bestätigt werden.

### 3.1.8 Vergleich der Phloemspezifität mittels Carbohydratanalyse

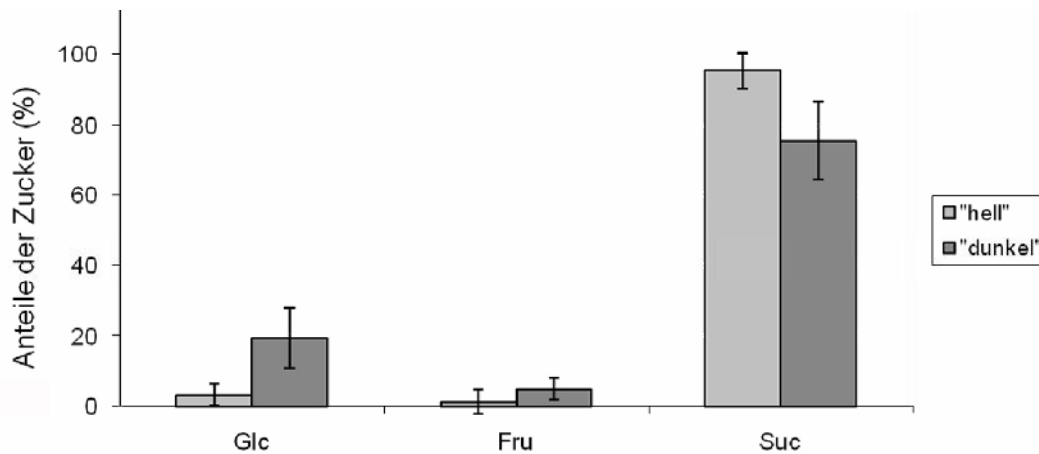
Weitere Aussagen über die Phloemspezifität der EDTA-Probe sollten mit Hilfe einer Analyse der Zucker aus den unterschiedlichen Sammeltechniken getroffen werden (Abb. 3.8). Der Saccharoseanteil der Stylektomieprobe erreichte nach einer Lichtphase von 8h einen durchschnittlichen Anteil von 96% bei einer Saccharosekonzentrationen von 150-240mM. Der 96% Saccharoseanteil diene als Referenzwert für eine hohe Phloemspezifität. Mit Hilfe der EDTA-Methode konnte dagegen nur ein Saccharose Anteil von durchschnittlich 67% erreicht werden. Durch eine weitere Messung der verschiedenen Zucker aus einem Gesamtblattextrakt, mit einem durchschnittlichen Saccharose Anteil von 23% ist mit einem zusätzlichen Anteil von nicht-phloemspezifischer Saccharose in der EDTA-Probe zu rechnen. Interpretiert man den Anteil von Hexosen aus EDTA-Proben (Abb. 3.8) als Verunreinigungsgrad, unterstützen die Daten der Carbohydratanalyse den Anteil von nicht-phloemspezifischen Proteinen aus EDTA-Proben.



**Abb. 3.8:** Carbohydratanalyse aus Stylektomie, EDTA und Blattextrakt Proben (*Hv. cv. Pallas*, 21d). Im Vergleich zur Stylektomieprobe (Sty) lässt sich ein reduzierter Anteil von Saccharose in EDTA-Proben und Blattextrakt-Proben (Ext) feststellen. Die Exsudationsdauer der Stylektomie- und EDTA-Probe betrug jeweils 6h. (Saccharose=Suc, Fructose=Fru, Glucose=Glc)

Im Laufe der Zuckeranalysen aus Stylektomieproben konnten außerdem Veränderungen bezüglich der Zusammensetzung der Zuckeranteile in Abhängigkeit von der Belichtung festgestellt werden. Nach einer Lichtphase ( $60\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) von 8h konnte in allen gemessenen Stylektomieproben ( $n=14$ ) ein Saccharoseanteil von 96% und ein sehr geringer Anteil an Hexosen bestimmt werden. Erfolgte die Probenentnahme nach einer Dunkelphase von 8h erhöhten sich der Glukoseanteil von 3% auf 21% (t-Test:  $P = <0,001$ ) und der Fruktoseanteil von 1% auf 7% (t-Test:  $P = 0,039$ ; Abb. 3.9). Nach einer 8h Belichtung des Versuchsansatzes „dunkel“ und erneuter Probensammlung aus den verbleibenden exsudierenden Stiletten stellte sich der erhöhte Anteil von Hexosen nach erneuter Belichtung als reversibel heraus. Ebenso konnte aus den verbleibenden Stiletten der belichteten Pflanzen nach der ersten Probenentnahme und anschließender Verdunklung (8h) der Pflanzen ein erhöhter Hexosenanteil ermittelt werden.

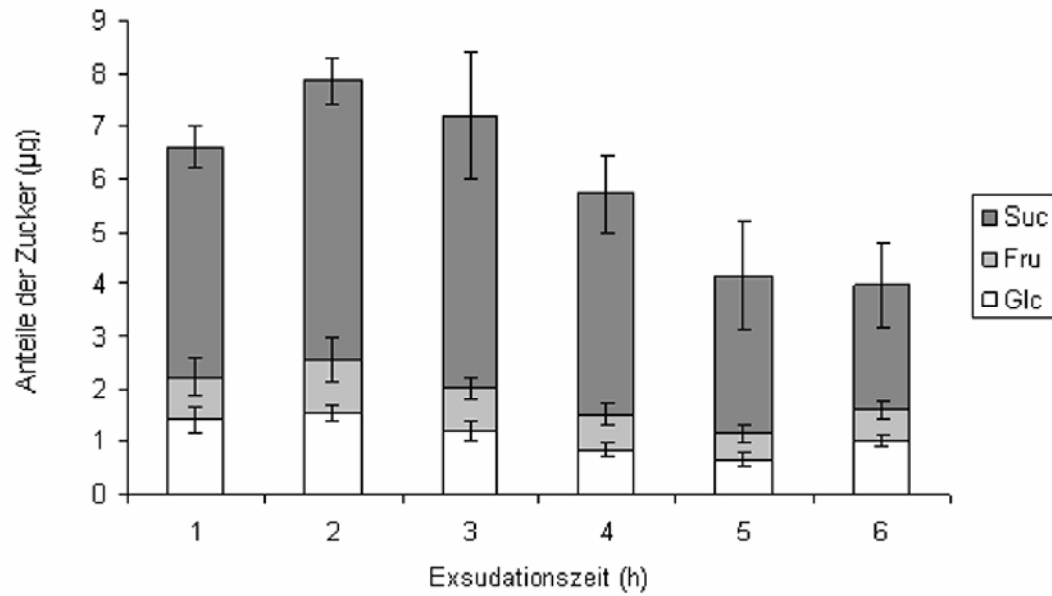




**Abb. 3.9:** Vergleich der Zuckerverteilung in Stylektomieproben aus *Hv. cv. Pallas* nach einer Lichtphase von 8h (Ansatz „hell“) und nach einer Dunkelphase von 8h (Ansatz „dunkel“). (Saccharose=Suc, Fructose=Fru, Glucose=Glc) t-Test: Glc ( $P = <0,001$ ) Fru ( $P = 0,039$ ) Suc ( $P = <0,001$ ).

Anhand des Saccharoseanteils von EDTA-Proben wurde die Effektivität zur Abgabe von phloemspezifischen Proteinen über einen Zeitraum von 6h untersucht (Abb. 3.10). Das Exsudationsmedium wurde dazu nach jeweils 1h ausgetauscht und mittels HPLC analysiert. Dabei konnte eine Abnahme des Saccharoseanteils und damit wahrscheinlich auch eine verminderte Abgabe von phloemspezifischen Proteinen nach 4h ( $P < 0,05$ ) festgestellt werden. Außerdem kann man aufgrund der hohen Standardabweichung nach der 2. Stunde der Exsudation auf eine unterschiedliche Abgabe einer phloemspezifischen Probe der einzelnen Pflanzen schließen. Ideal erscheint damit eine Sammelzeit von nur 2h mit der doppelten bis dreifachen Anzahl von Pflanzen (ca. 120-180). Die resultierende Menge an Exsudationsmedium (ca. 40-60ml) lässt sich aber nur sehr zeitaufwendig (3-4 Tage) einengen. Eine Verwendung von größeren Filtermembranen (Vivaspin20 Durchflusskonzentrator) für einen schnelleren Durchfluss des EDTA-Mediums führte in einigen Versuchen zu hohen Proteinverlusten, die wahrscheinlich auf eine hohe Bindekapazität der großen Membranfläche zurückzuführen sind. Eine Vorbehandlung der verwendeten Vivaspin2 (2ml) Filtereinheiten mit einer 5% Tween-20 Lösung nach Herstellerangaben, führte zu einer höheren und konstanteren Proteinkonzentration. Die Probensammlung mit der EDTA-Methode wurde für die folgenden Experimente auf 6h standardisiert. Alle weiteren Versuche wurden im 4-Blattstadium der Gerste (21 Tage) mit dem Kultivar Pallas oder Pallas *mlo5* durchgeführt.



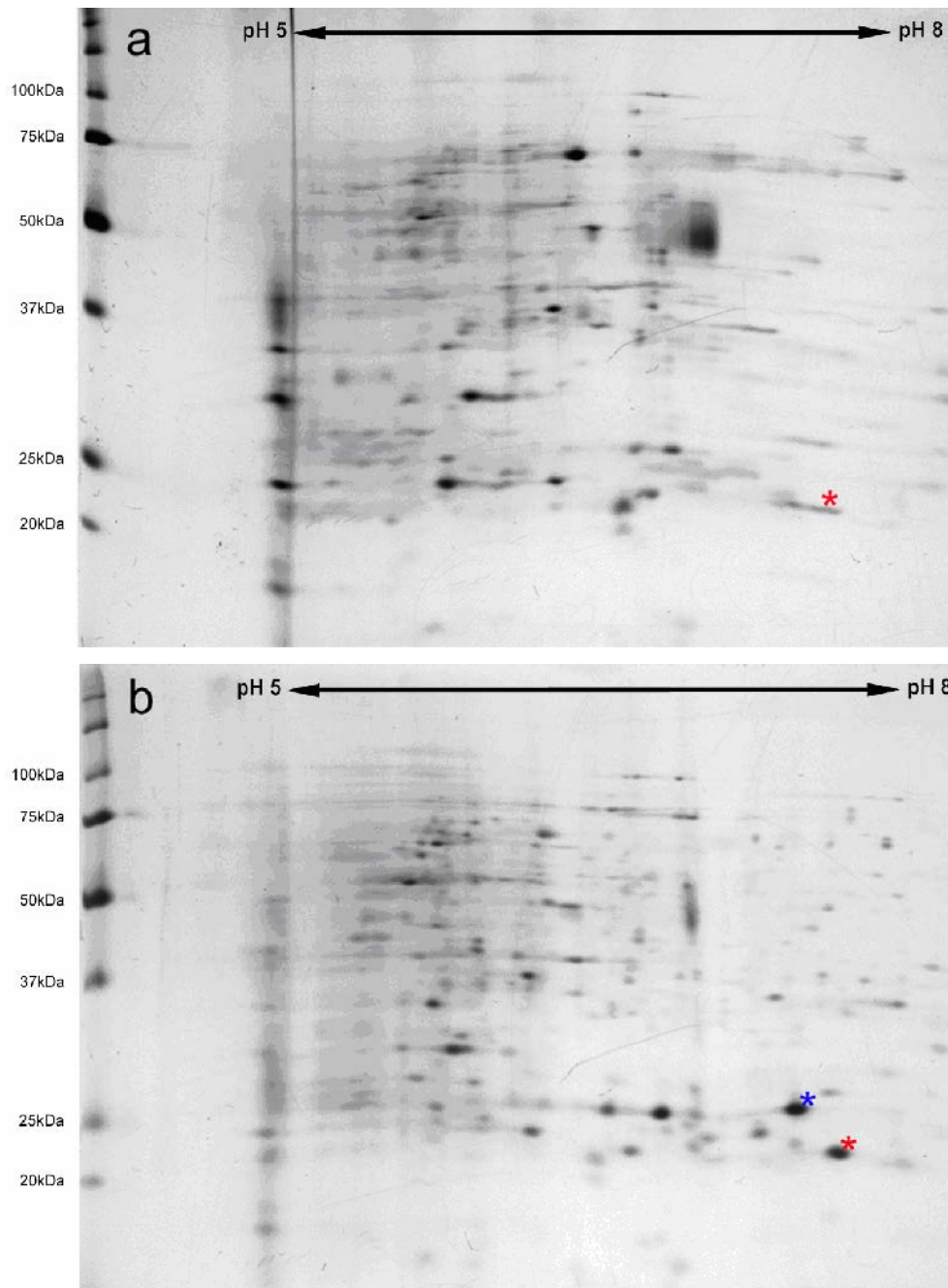


**Abb. 3.10:** Veränderungen der Zuckerzusammensetzung während einer EDTA-Exsudation aus einer Gerstenpflanze *Hv. cv. Pallas*, 21d, n=5. Das Exsudationsmedium wurde stündlich erneuert und jeweils mittels HPLC analysiert. (Saccharose=Suc, Fructose=Fru, Glucose=Glc)

### 3.2 Phloemspezifische Untersuchungen der Gerste

#### 3.2.1 Proteinanalyse von EDTA-Proben nach Inokulation der Gerste mit *Bgh*

Nachdem die Verwendbarkeit der EDTA-Methode zur Gewinnung von phloemspezifischen Proteinen aus der Gerste überprüft wurde, sollten die Proteinmuster der Exsudate aus *Bgh*-inokulierten Gerstenpflanzen mit unbehandelten Pflanzen (Kontrolle) verglichen werden.

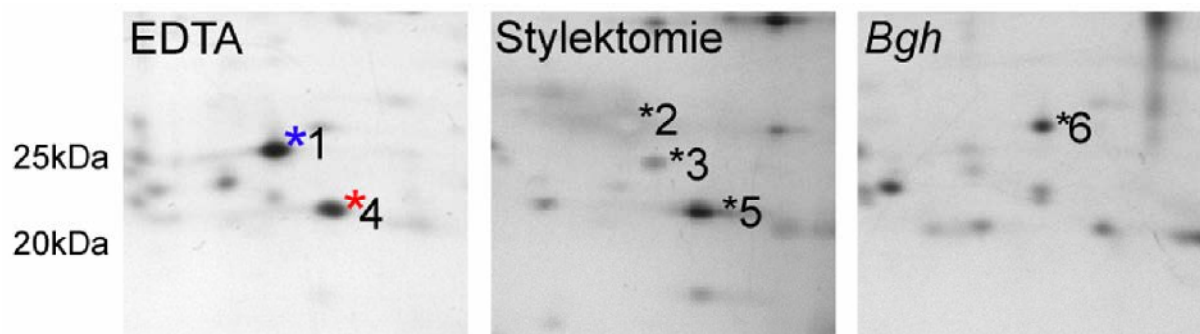


**Abb. 3.11:** Zweidimensionale Auftrennung und Silberfärbung von Proteinen aus EDTA-Proben (*Hv. cv. Pallas mlo5*). a) Kontrolle b) +*Bgh* 16-22hai, auffällige Veränderungen nach Inokulation der gesamten Pflanzen mit *Bgh* sind durch Markierungen gekennzeichnet (\*rot=23kDa Spot und \*blau=26kDa Spot)

Durch die unkomplizierte Probengewinnung mit der erleichterten Exsudation konnten verschiedene Zeitpunkte nach Inokulation mit *Bgh* überprüft werden. Ab einem Zeitraum von 16-22hai (6h Exsudationsdauer) konnten mit Hilfe der EDTA-Methode zwei hochregulierte Proteinspots aus inokulierten Pflanzen gegenüber der Kontrolle festgestellt werden (Abb. 3.11).

### 3.2.2 Identifizierung der Proteine

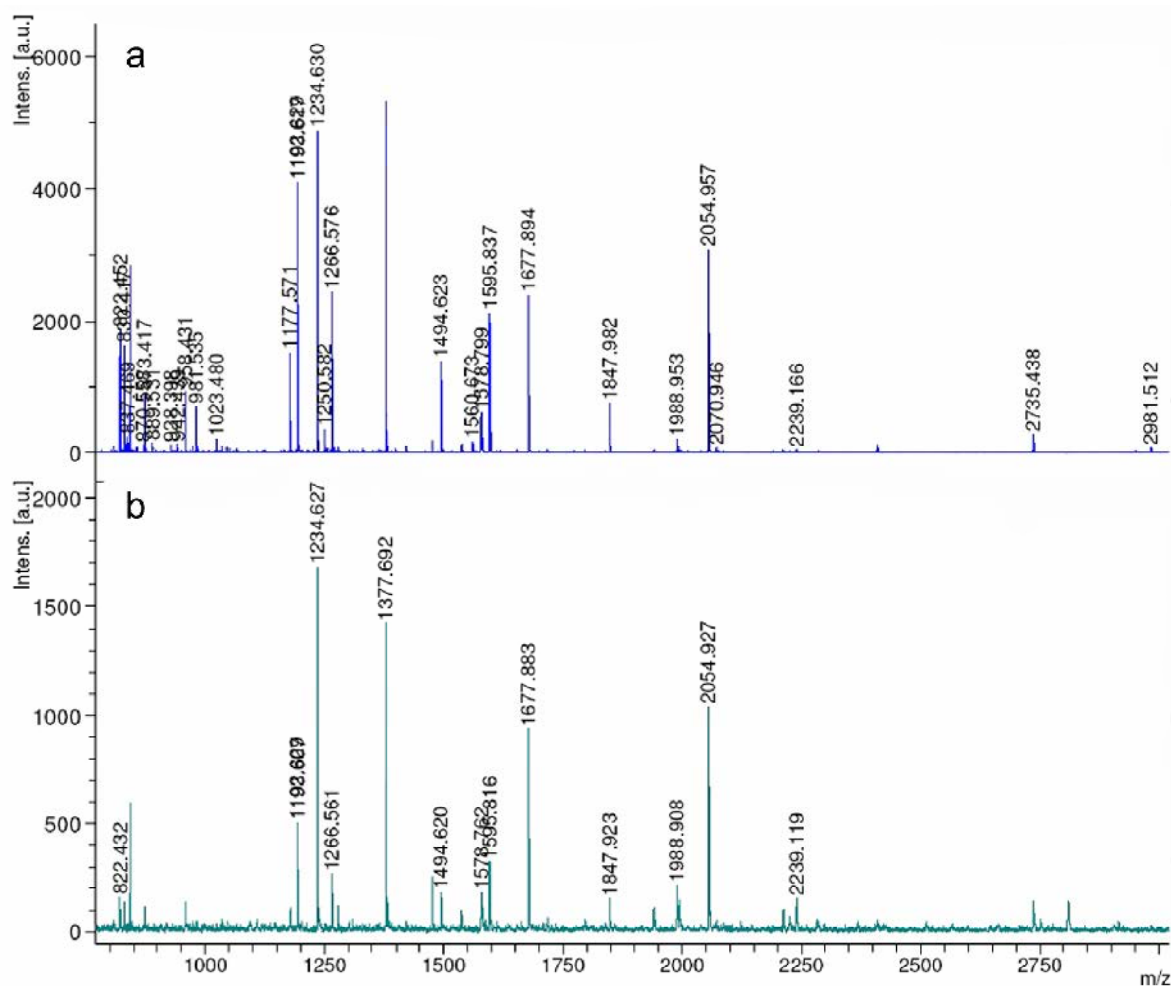
Mit Hilfe der MALDI-TOF-MS und der Datenbanksuche mittels MASCOT wurden das nach *Bgh*-Befall hochregulierte 23kDa Protein (Abb. 3.12; EDTA \*4) und das 26kDa Protein (Abb. 3.12; EDTA \*1) aus EDTA-Proben mit den nahezu deckungsgleichen Proteinspots (Abb. 3.12; Stylektomie \*2,\*3,\*4) aus Stylektomieproben identifiziert und verglichen.



**Abb. 3.12:** Ausschnittvergrößerungen der Proteintrennungen aus Abb. 3.11.b (EDTA) und Abb. 3.6.b. (Stylektomie). Übersicht der massenspektrometrisch analysierten Proteinspots aus EDTA-, Stylektomieproben und *Bgh*-Sporen. Analysiert wurden die nach *Bgh* Befall hochregulierten Proteinspots (\*1,\*4) aus EDTA-Proben und die entsprechend lokalisierten Proteinspots (\*2,\*3,\*5) aus Stylektomieproben und *Bgh*-Sporen (\*6).

Die Spektren des 26kDa Spots (Abb. 3.12 \*1) aus der EDTA-Probe lieferten während der Datenbankrecherche keine Übereinstimmungen. Durch eine zweidimensionale Auftrennung von Mehltausporenproteinen und einer weiteren Analyse eines 26kDa Proteins aus den Konidiosporen (Abb. 3.12 \*6) konnte der Proteinspot auf eine Kontaminierung mit Mehltausporen im Exsudationsmedium zurückgeführt werden. Dies konnte durch eine ausschließliche Inokulierung der Blattspitzen (siehe 3.2.4) bestätigt werden. Mit der Verwendung einer Inokulationsbox (Abb. 2.1 a, b) konnte der 26kDa Spot (Abb. 3.12 \*1, \*6) nicht mehr im Proteingel identifiziert werden. Der Deckungsgleiche Spot (Abb. 3.12 \*3) aus der Stylektomieprobe konnte aufgrund der geringen Proteinmenge nicht bestimmt werden. Der ebenfalls nahezu deckungsgleiche Spot (Abb. 3.12 \*2, mit „negativer Silberfärbung“) konnte als

*putative splicing regulatory protein* einem RNA bindenden Protein aus der *Arabidopsis thaliana* Datenbank identifiziert werden (*putative RRM-containing protein* - *Arabidopsis thaliana*; Q8LA96). Eine Hochregulierung nach Mehltau-Befall konnte für dieses Protein jedoch nicht festgestellt werden. Die Spektren der 23kDa Spots (Abb. 3.13) aus EDTA- und Stylektomieproben (Abb. 3.12 \*4 und \*5) ergaben Identische Datenbanktreffer des Proteins P23K-3 (Hypothetical protein *Hordeum vulgare*: Q0KKC4).



**Abb. 3.13:** Spektren der deckungsgleichen 23kDa Spots (Abb. 3.12 \*4 und \*5) aus der EDTA-Probe (a) und aus der Stylektomieprobe (b).

Eine BLAST-Suche des Proteins P23K-3 (Q0KKC4) in der UniProt Datenbank (<http://www.uniprot.org/>) ergab eine hohe Übereinstimmung mit 3 weiteren Proteinen aus der P23K-Proteinfamilie sowie eine hohe Übereinstimmung mit dem jasmonsäureinduzierbaren 23kDa Protein JIP-23 (P32024) aus *Hordeum vulgare* (Abb. 3.14). Die P23K-Proteine wurden von Kidou et al. (2006) aus dem Gerstenkultivar Minorimugi sequenziert. Alle P23K-Proteine und JIP-23 besitzen eine

Länge von 210 Aminosäuren. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz wurden die Spektren nochmals manuell analysiert.






Alignments	Accession	Entry name	Status	Protein names	Organism	Length	Identity	Score	E-Value
	Q0KKC4	Q0KKC4_HORVU	★	Putative uncharacterized protein p23k-3	Hordeum vulgare (Barley)	210	100.0%	1,138	1.0×10 <sup>-123</sup>
	Q0KKC3	Q0KKC3_HORVU	★	Putative uncharacterized protein p23k-4	Hordeum vulgare (Barley)	210	99.0%	1,132	1.0×10 <sup>-122</sup>
	Q0KKC5	Q0KKC5_HORVU	★	Putative uncharacterized protein p23k-2	Hordeum vulgare (Barley)	210	95.0%	1,096	1.0×10 <sup>-118</sup>
	Q0KKC6	Q0KKC6_HORVU	★	Putative uncharacterized protein p23k-1	Hordeum vulgare (Barley)	210	95.0%	1,091	1.0×10 <sup>-117</sup>
	P32024	J123_HORVU	★	23 kDa jasmonate-induced protein	Hordeum vulgare (Barley)	210	87.0%	1,020	1.0×10 <sup>-109</sup>

Abb. 3.14 BLAST der Aminosäuresequenz von P23K-3 (Q0KKC4). Neben den hohen Übereinstimmungen von P23K-4 (Q0KKC3), P23K-2 (Q0KKC5) und P23K-1 (Q0KKC6) konnte eine 87% Übereinstimmung für das Jasmonsäure induzierte 23kDa Protein (JIP-23; P32024) aus *Hordeum vulgare* ermittelt werden.

Dabei konnte eine Identifizierung der zu je 95% identischen Proteine P23K-1 und P23K-2 ausgeschlossen werden. P23K-3 unterscheidet sich von P23K-4 nur an der Position 131 der Aminosäuresequenz. Die Aminosäure Threonin in P23K-3 wird in der Sequenz von P23K-4 durch Prolin ersetzt. Durch den Trypsin-Verdau entstehen an der differentiellen Stelle kleine Peptide mit 660Da (P23K-3) und 656Da (P23K-4), die nicht für die Datenbanksuche annotiert werden. Im Spektrum der EDTA-Probe konnten beide Massen identifiziert werden, im Spektrum der Stylektomieprobe waren die einzelnen Massen nicht messbar.

1	MASGVFGTPISEKTVIATGEYKEPITQKDVADYTMKMINAGGKDINAQTFVDNLKERYGN	60	Q0KKC4	P23K-3
1	MASGVFGTPISEKTVIATGEYKEPITQKDVADYTMKMINAGGKDINAQTFVDNLKERYGN	60	Q0KKC3	P23K-4
1	MASGVFGTPISEKTVIATGEYKEPITQKDVADYAMKMINAGGKDINAQTFVDNLKERYGN	60	Q0KKC5	P23K-2
1	MASGVFGTPISEKTVIATGEYKEPITQKDVADYAMKMINAGGKDINALTFVDNLKERYGN	60	Q0KKC6	P23K-1
*****				
61	GIAVKCLINATGATLSLAKYNDWHGHIYDTPYPSDIQNGQWGAFLHVHPSGAAVGSAGA	120	Q0KKC4	P23K-3
61	GIAVKCLINATGATLSLAKYNDWHGHIYDTPYPSDIQNGQWGAFLHVHPSGAAVGSAGA	120	Q0KKC3	P23K-4
61	GISVKCLINATGATLSLAKYNDWHGHIYDTPYPSDIQNGQWGAFLHVHPSGAAVGSAGA	120	Q0KKC5	P23K-2
61	GIAVKCLINATGATLSLAKYNDWHGHIYDTPYPSDIQNGQWGAFLHVHPSGAAVGSAGA	120	Q0KKC6	P23K-1
**.*				
121	VVYRSKIPSSRSCDWLFSWTVPYIGANGVYTEIREEGHYPNVGSWGYIYGVKLANSNLDN	180	Q0KKC4	P23K-3
121	VVYRSKIPSSRSCDWLFSWTVPYIGANGVYTEIREEGHYPNVGSWGYIYGVKLANSNLDN	180	Q0KKC3	P23K-4
121	VVYRTKIPSSSRSCDWLFSWTVPYIGDNGVYTEIREEGHYPSVGSWGYIYDVKLANSNLDN	180	Q0KKC5	P23K-2
121	VVYRTKIPSSSRSCDWLFSWTVPYIGDNGVYTEIREEGHYPSVGSWGYIYGVKLANSNLDN	180	Q0KKC6	P23K-1
****.*				
181	STDKNYGYVSKTNIGEGSTMNARGVFQYPY	210	Q0KKC4	P23K-3
181	STDKNYGYVSKTNIGEGSTMNARGVFQYPY	210	Q0KKC3	P23K-4
181	STDKNYGYVSKTNIGEGSTMNARGVFQFPY	210	Q0KKC5	P23K-2
181	STDENYGYVSKTNIGEGSTMNARGVFQFPY	210	Q0KKC6	P23K-1
***.*				

Abb. 3.15: **Alignment** der Aminosäuresequenz (FASTA Format) der Proteine P23K-3 (Q0KKC4), P23K-4 (Q0KKC3), P23K-2 (Q0KKC5) und P23K-1 (Q0KKC6). Die differentielle Stelle zwischen P23K-3 und P23K-4 ist gelb markiert.



Eine unterschiedliche Funktion der Isoformen von P23K ist bis heute unbekannt. Das Protein beinhaltet außerdem keine bekannten konservierten Domänen. Mit Hilfe des Programms Prosite (<http://expasy.org/prosite/>) lassen sich einige Aminosäuresequenzen identifizieren, die posttranslationale Modifikationen zulassen. Dazu gehören N-Myristoylierung, N-Glycosilierung und potentielle Phosphorylierungsstellen an Serin/Threonin Resten. Durch die zu 87% übereinstimmende Aminosäuresequenz (Abb. 3.16) zu JIP-23 (P32024) ist eine Einbindung in Jasmonsäure induzierte Signalketten ebenfalls möglich.

```

1  MASGVFGTPISAQTVIATGEYKEPITQKDVADYAMKMINAGGKDVNAQKFVDNLKERYGN  60  P32024  JIP-23
1  MASGVFGTPISEKTATVIATGEYKEPITQKDVADYTMKMINAGGKDINAQTFVDNLKERYGN  60  Q0KKC4  P23K-3
   ***** : ***** : ***** : ***** : ***** : *****

61  GIAVKCLLYNATGATLNFACYNDWHGHIYDTPYPSDIQNGQWGAFLHVHPSGAAAGSAGA  120  P32024  JIP-23
61  GIAVKCLLYNATGATLSLAKYNDWHGHIYDTPYPSDIQNGQWGAFLHVHPSGAAVGSAGA  120  Q0KKC4  P23K-3
   ***** : ***** : ***** : ***** : ***** : *****

121  VVYRSKIPSSSSCDWLF SWTVPYIGNGVYTEIREEGHYPSVGSWDYIYNVCLKNSSVT  180  P32024  JIP-23
121  VVYRSKIPSSSTRCDWLF SWTVPYIGANGVYTEIREEGHYPNVGSWGYIYGVKLANSDLN  180  Q0KKC4  P23K-3
   ***** : ***** : ***** : ***** : ***** : *****

181  SIDSNYGYVSKADIGEGTTMNARGVFEPFY  210  P32024  JIP-23
181  STDKNYGYVSKTNIGEGSTMNARGVFQYPY  210  Q0KKC4  P23K-3
   * * . ***** : : ***** : ***** : : *

```

**Abb. 3.16 Alignment der Aminosäuresequenz (FASTA Format) der Proteine P23K-3 (Q0KKC4) und JIP-23 (P32024)**

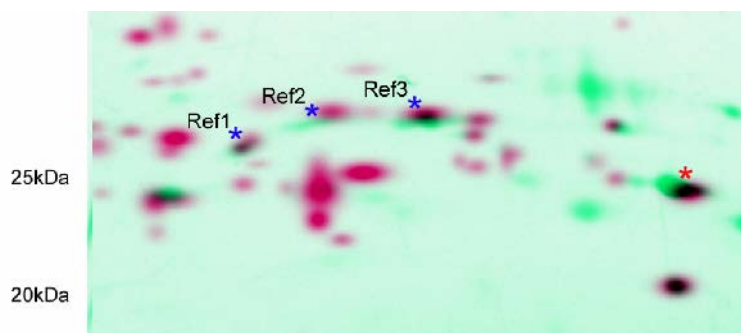
Mit Hilfe eines *virus-induced gene silencing* (VIGS) von P23K (Oikawa et al. 2007, Oikawa et al. 2009) konnte eine essentielle Rolle des Proteins auf die (1,3;1,4)- $\beta$ -D-Glucan Synthese und ein Einfluss auf die sekundäre Zellwandbildung der Gerste nachgewiesen werden. Aufgrund der nicht eindeutigen Identifizierung und fehlender Sequenzdaten der Proteine P23K-3 und P23K-4 im Kultivar Pallas, wird das Protein nachfolgend als P23K-3/4 bezeichnet.

### 3.2.3 Quantifizierung und Fluoreszenzfärbung von Referenzproteinen und P23K-3/4

Um eine Hochregulierung bzw. einen verstärkten Transport von P23K-3/4 in *Bgh* inokulierten Pflanzen gegenüber der Kontrolle korrekt beurteilen zu können, mussten die gewonnenen Phloemproteine der Kontrolle und den inokulierten Pflanzen, für die keine eindeutige Änderung durch Mehltaubefall festzustellen war, eine möglichst ähnliche Proteinmenge aufweisen. Dazu wurden aus den Auftrennungen der EDTA-Probe 3 phloemspezifische (zur Stylektomieprobe deckungsgleiche) Referenzspots ausgewählt (Abb. 3.17, blaue Markierung). Für eine optimale Vergleichbarkeit der



Proteinmuster (Kontrolle/+*Bgh*) mussten diese Referenzspots in der Kontrolle und in den Proteinauftrennungen der inokulierten Pflanzen eine möglichst ähnliche Intensität zeigen, während die Pixelintensität des P23K-3/4 Spots (+*Bgh*) eine höhere Proteinkonzentration anzeigt (Hochregulierung). Ebenfalls wurde von einer eindeutigen Hochregulierung von P23K-3/4 nach Mehltaubefall ausgegangen, wenn die Pixelintensitäten der Referenzspots der Kontrolle eine höhere Phloemspezifität anzeigten und die Pixelintensität des P23K-3/4 Spots (+*Bgh*) trotzdem gegenüber der Kontrolle erhöht war (siehe Abb. 3.21)



**Abb. 3.17 Ausschnittvergrößerung aus Abb. 3.7. Dargestellt sind die ähnlich lokalisierten Referenzspots (Ref1-Ref3, blaue Markierung) aus Stylektomie- und EDTA-Proben, die zur Beurteilung der Phloemspezifität von vergleichenden Proteinauftrennungen (Kontrolle/+*Bgh*) verwendet wurden. (rote Markierung=P23K-3/4)**

Aufgrund des kleinen Linearitätsbereiches einer Silberfärbung und den Abweichungen zwischen den Referenzspots wurden die Ergebnisse mit dem Fluoreszenzfarbstoff Flamingo Protein Stain (Biorad) abgesichert. Fluoreszenzfarbstoffe zeigen eine, im Gegensatz zur verwendeten Silberfärbung, verminderte Sensitivität und eine mit der Coomassiefärbung vergleichbare Linearität (Berggren et al. 2000). Auch mit der Verwendung der Fluoreszenzfärbung (Abb. 3.18, n=2) konnte eine Hochregulierung bzw. eine verstärkte Exsudation an der basalen Probenentnahmestelle der Blätter bestätigt werden. Für weitere Reproduktionen der Ergebnisse mit identischer Probenentnahme, aber einer ausschließlichen Inokulation der Blattspitzen (3.2.4), wurde trotzdem die Silberfärbung angewendet. Anhand der verwendeten Fluoreszenzfärbung und deren Empfindlichkeit (Detektionsgrenze ca. 7,5ng Protein, Berkelman et al. 2009) wurde deutlich, dass die ermittelten Proteinmengen (Ref1-3, P23K-3/4) in einem weitgehend linearen Bereich (1-30ng Protein) der Silberfärbung liegen. (Poehling und Neuhoff 1981).

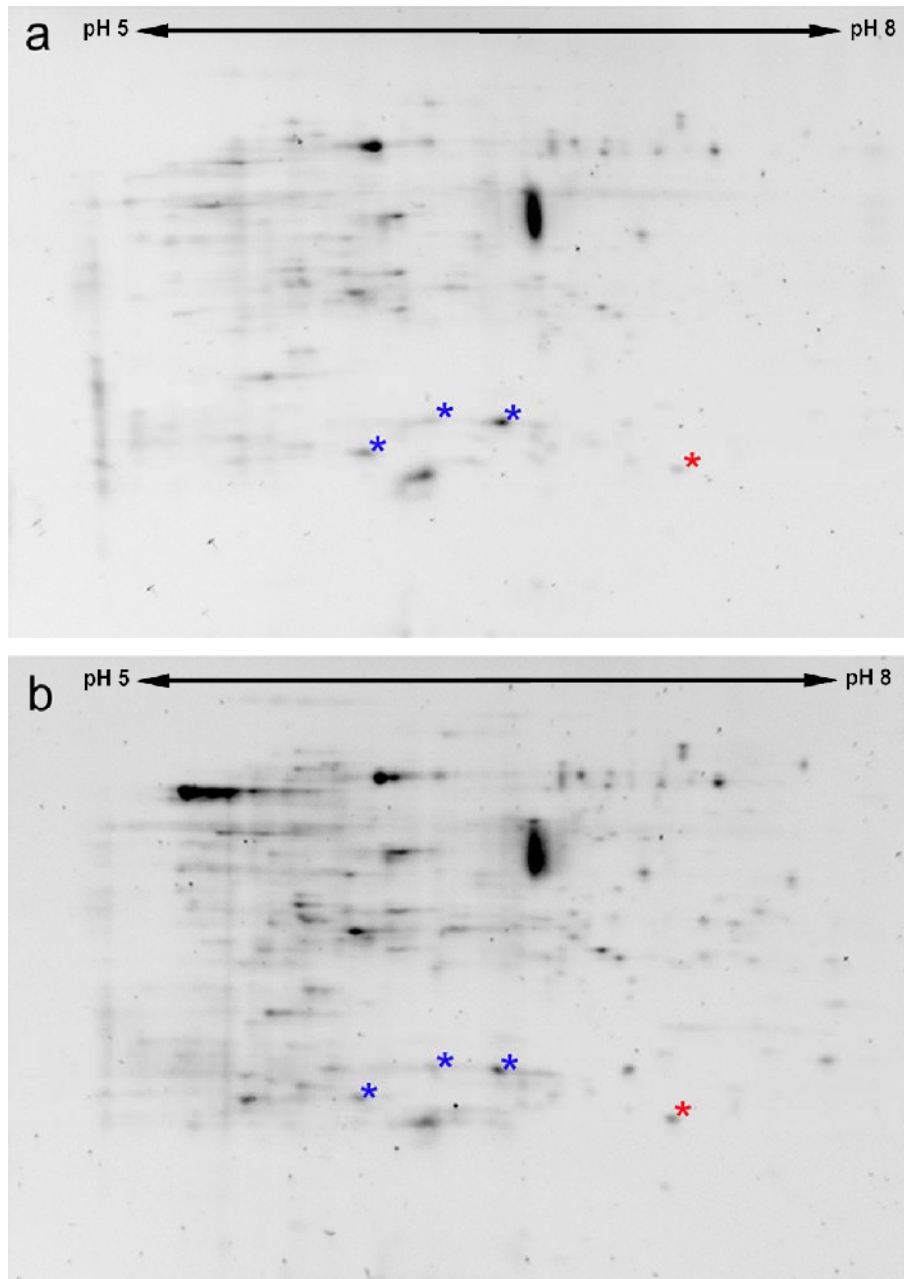
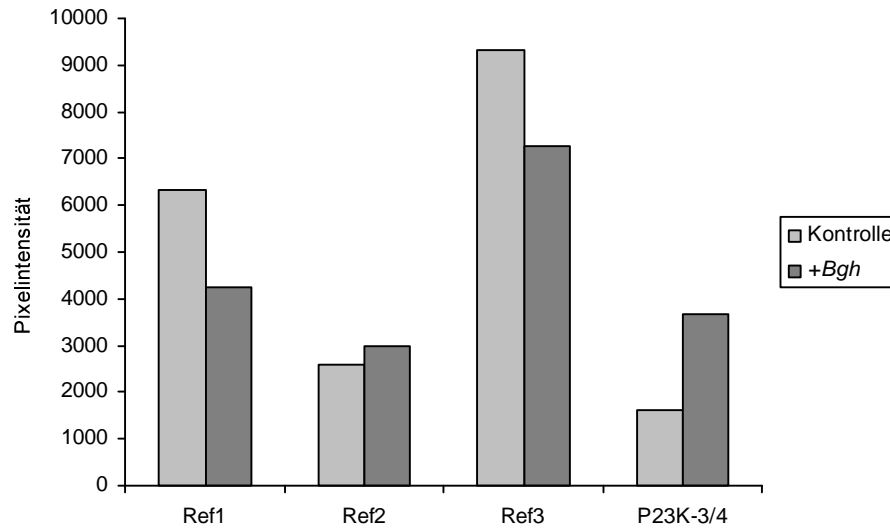


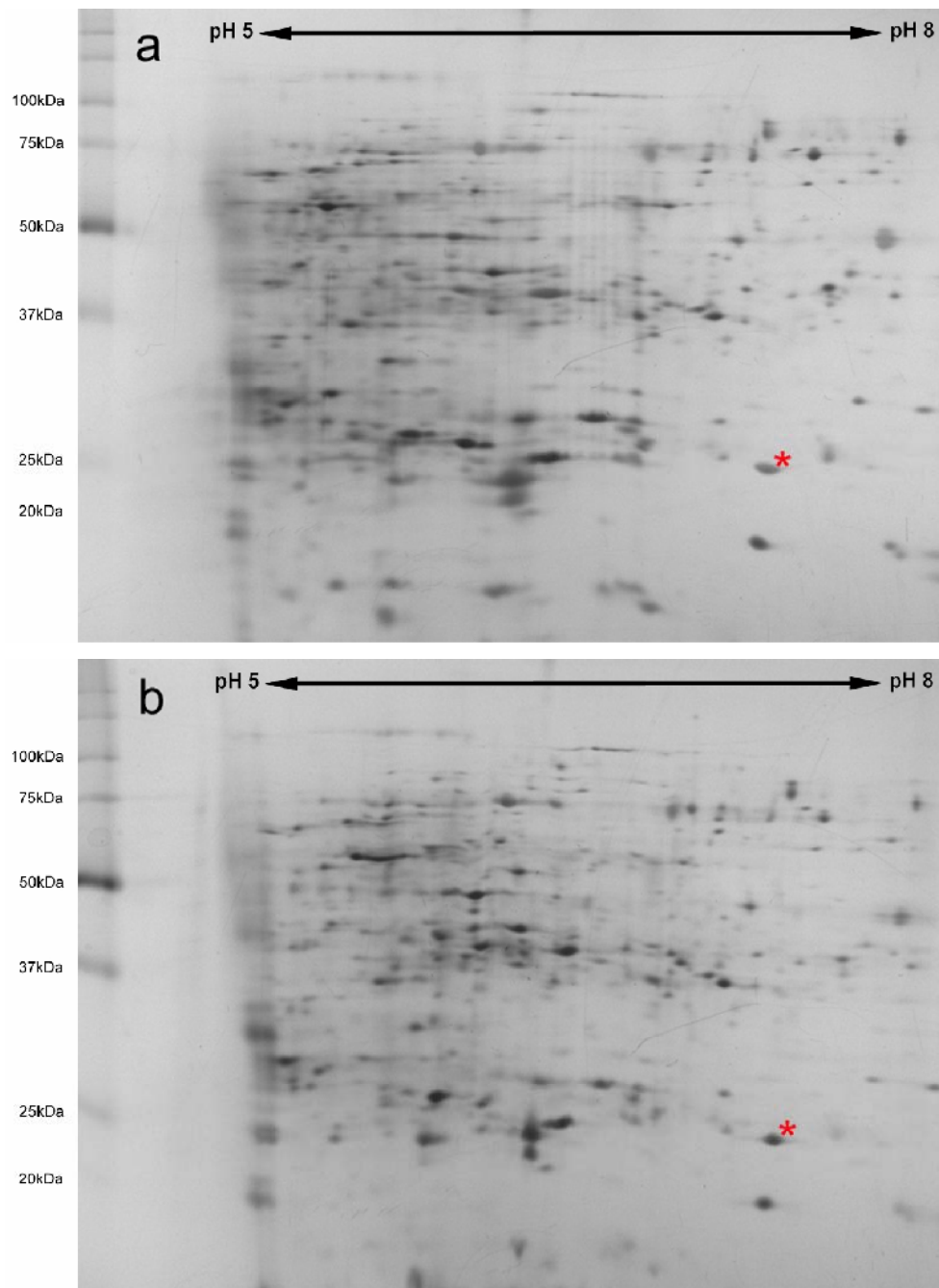
Abb. 3.18: Zweidimensionale Auftrennung und Fluoreszenzfärbung von Proteinen aus EDTA-Proben (*Hv. cv. Pallas*). a) Kontrolle b) +*Bgh* 16-22hai, \*rot=P23K-3/4, phloemspezifische Referenzspots sind blau markiert. Die Quantifizierung der markierten Proteine ist in Abb. 3.19 dargestellt. Die Proteinmenge der Referenzspots liegt im Bereich der Detektionsgrenze von ca. 7,5ng. Der Proteinstandard wird nicht durch den Fluoreszenzfarbstoff angefärbt.



**Abb. 3.19:** Quantifizierung der Referenzspots (Ref1-3) und des Proteins P23K-3/4 aus der zweidimensionalen Proteintrennung (Abb. 3.18). Die Pixelintensitäten der phloemspezifischen Referenzspots zeigen eine relativ geringe Abweichung bzw. eine leicht erhöhte Phloemspezifität der Kontrolle an. Die Pixelintensität von P23K-3/4 zeigt dagegen eine Hochregulierung nach 16-22h mit *Bgh*.

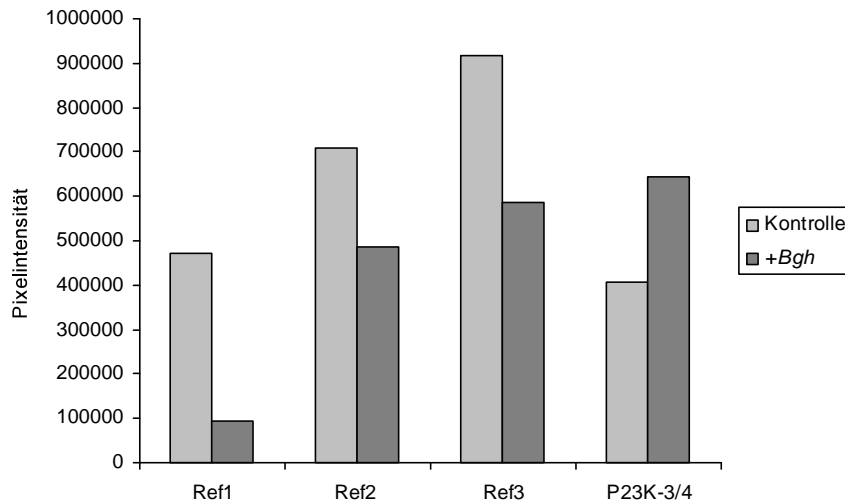
### 3.2.4 Systemischer Einfluss von *Bgh* auf die Regulierung von P23K-3/4

Nachdem mit der EDTA-Methode eine Hochregulierung von P23K-3/4 nach Inokulation der gesamten Gerstenpflanzen festgestellt wurde, sollte eine systemische Hochregulierung bzw. eine erhöhte systemisch transportierte Menge von P23K-3/4 nachgewiesen werden.



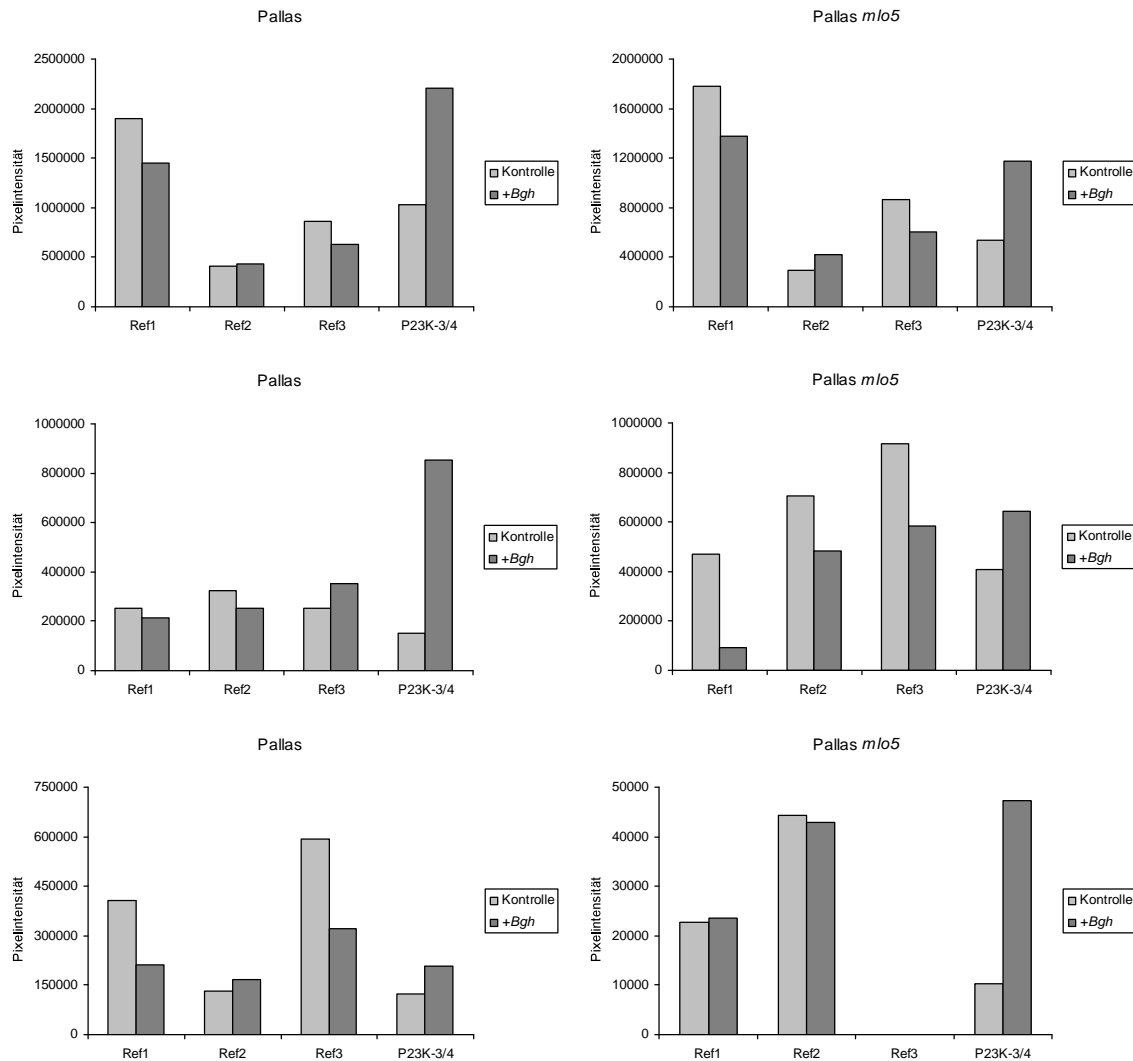
**Abb. 3.20:** Zweidimensionale Auftrennung und Silberfärbung von Proteinen aus EDTA-Proben (*Hv. cv. Pallas mlo5*) a) Kontrolle, b) +*Bgh* 16-22hai. Eine Hochregulierung von P23K-3/4 (\*rot) konnte auch nach ausschließlicher Inokulierung der Blattspitzen festgestellt werden. Die Quantifizierung der Proteine ist in Abb. 3.21 dargestellt.

Nach ausschließlicher Inokulierung der Blattspitzen (ca. 1/3 der Blattspreite) der 2., 3. und 4. Blätter konnte ebenfalls ein erhöhter Anteil von P23K-3/4 an der basalen Probenentnahmestelle der Blätter festgestellt werden (Abb. 3.20, 3.21).



**Abb. 3.21:** Quantifizierung der Referenzspots (Ref1-3) und des Proteins P23K-3/4 aus der Kontrolle und mit *Bgh* (16-22hai) inokulierten Pflanzen. Die entsprechenden Proteinauftrennungen sind in Abb. 3.20 dargestellt. Die Phloemspezifität der Kontrolle erreicht deutlich höhere Werte als die entsprechenden Referenzproteine der inokulierten Pflanzen. Trotzdem erreicht die Proteinquantifizierung von P23K-3/4 höhere Werte als die Kontrolle.

Eine Hochregulierung von P23K-3/4 nach Mehltaubefall konnte in allen Reproduktionen (Abb. 3.22) bestätigt werden, wenn die Abweichungen der Referenzspots eine Auswertung der Versuche zuließen. Dagegen konnte in keinem Experiment nach Inokulation mit *Bgh* eine erhöhte Menge von P23K-3/4 in den Proteintrennungen der Kontrolle festgestellt werden. Zwischen dem Kultivar Pallas und Pallas *mlo5* konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden.



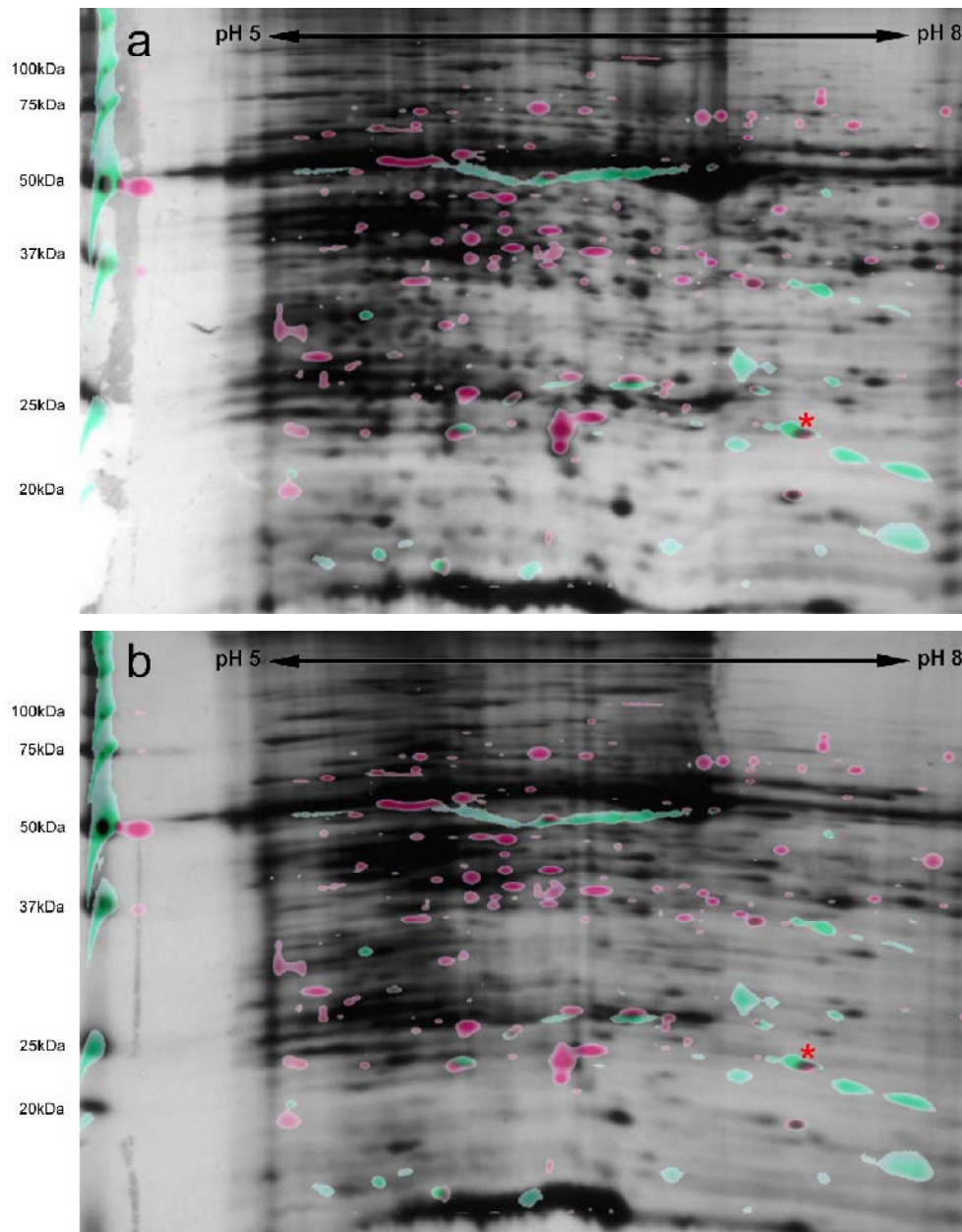
**Abb. 3.22: Übersicht der Reproduktionen von zweidimensionalen Proteinauftrennungen aus EDTA-Proben nach Inokulation der Blattspitzen mit *Bgh* (Silberfärbung). 16-22hai konnte in allen angefertigten Gelen eine Hochregulierung von P23K-3/4 nach Mehltaubefall festgestellt werden. Zwischen Pallas und Pallas *mlo5* konnten keine eindeutigen quantitativen Unterschiede bezüglich einer Regulierung von P23K-3/4 nach *Bgh*-Befall ermittelt werden. Vereinzelt wurden Referenzspots wegen vertikaler Streifenbildung im Gel nicht ausgewertet .**

### 3.2.5 Bestimmung der Phloemspezifität von P23K-3/4

Aufgrund der Ergebnisse von Oikawa et al. 2007, die P23K mRNA im Sklerenchym der Mittelrippe sowie am Blattrand von Gerste detektieren konnten, wurde zusätzlich das Proteom aus dem 3. Blatt des Kultivars Pallas untersucht. Im Falle eines P23K-3/4 Proteinspots in der Auftrennung einer Blattextraktprobe ist eventuell eine Verfälschung der Ergebnisse durch eine Freisetzung von P23K-3/4 aus nicht-phloemspezifischen Zellen zu erwarten. Obwohl die Blattextraktprobe geringe Phloemanteile enthielt, war in den Proteinmustern der Blattextraktprobe (Abb. 3.23) keine Identifizierung des P23K-3/4 Spots möglich. Daher ist zu erwarten, dass der gesamte Anteil von P23K-3/4 aus EDTA-Proben phloemspezifischen Ursprungs ist



und die Ergebnisse nicht von P23K-3/4 Anteilen aus übrigen Gewebeanteilen verfälscht werden. In allen Kontrollversuchen (n=4) zur Bestimmung der Phloemspezifität von P23K-3/4 zeigte die Blattextraktprobe der inokulierten Pflanzen eine deutlich schlechtere Fokussierung der Proteine. Möglicherweise wird das Laufverhalten der Proteine während der IEF durch *Bgh* induzierte Substanzen (z.B. Phenole) negativ beeinflusst.



**Abb. 3.23:** Zweidimensionale Proteintrennung einer Blattextraktprobe aus *Hv. cv. Pallas* (schwarze Proteinspots) a) Kontrolle b) +*Bgh* 18hai, dargestellt mit einer deckungsgleichen Überlagerung aus Abb. 3.7 (Stylektomieprobe=grüne Proteinspots; EDTA-Probe=rote Proteinspots). Die zweidimensionale Proteintrennung der Blattextraktprobe wurde mit 40µg Protein beladen und absichtlich überfärbt. Im Bereich von P23K-3/4 (\*rot) lassen sich keine deckungsgleichen Proteinspots in der Auftrennung der Blattextraktprobe feststellen, wodurch die Phloemspezifität von P23K-3/4 bestätigt wird.

### 3.2.6 Phloemspezifische Proteinanalyse aus Stylektomieproben nach Inokulation mit *Bgh*

Nachdem eine Hochregulierung von P23K-3/4 nach *Bgh*-Befall mit Hilfe der EDTA-Methode ermittelt wurde, sollten die Ergebnisse mit der Stylektomiemethode reproduziert werden.

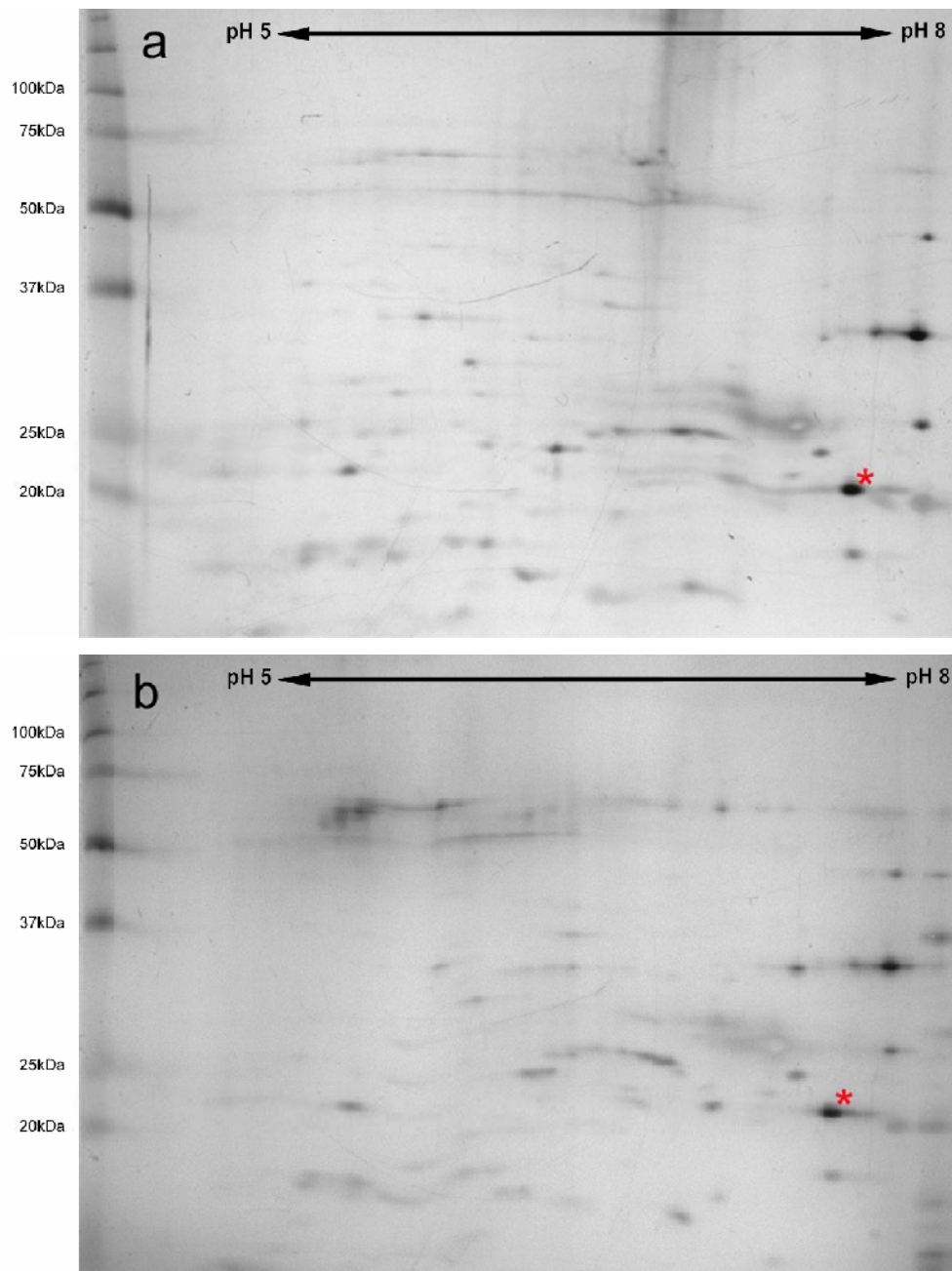
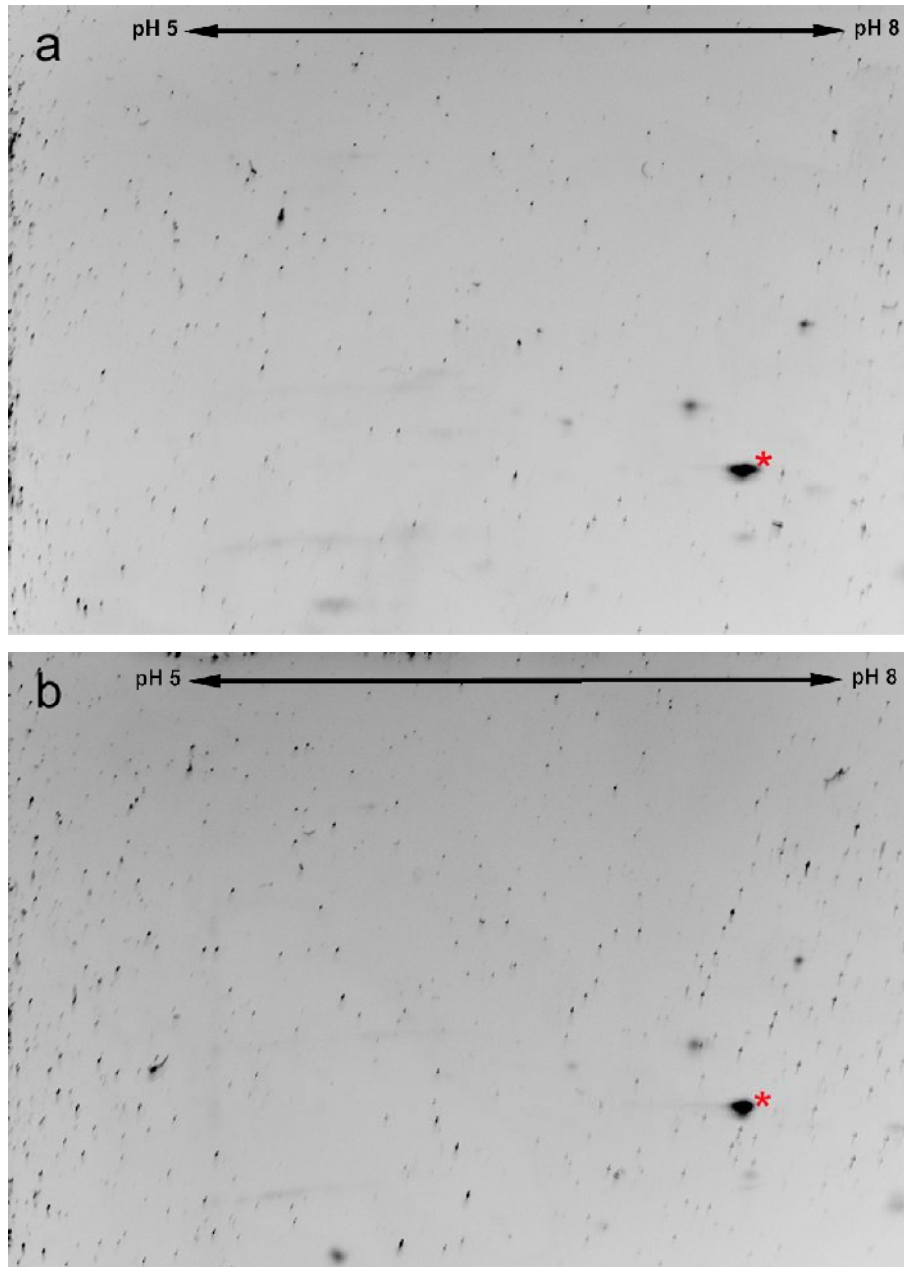


Abb. 3.24: Zweidimensionale Auftrennung und Silberfärbung von Proteinen aus Stylektomieproben aus *Hv. cv. Pallas mlo5* a) Kontrolle, 10µl Probenvolumen b) +*Bgh* 16-22hai, 10µl Probenvolumen, \*rot=P23K-3/4

Die Probenentnahme erfolgte ebenfalls über einen Zeitraum von 16-22hai. Die Intensitäten der P23K-3/4 Proteinspots zeigten in den Gelen der Stylektomieprobe

(Abb. 3.24, 3.25) keine Abweichung zwischen der Kontrolle und den inokulierten Pflanzen (n=3). Auch in der Kontrolle der Stylektomieprobe besitzt der P23K-3/4 Spot gegenüber den restlichen Phloemproteinen, im Gegensatz zur EDTA-Probe, eine auffällig hohe Intensität.



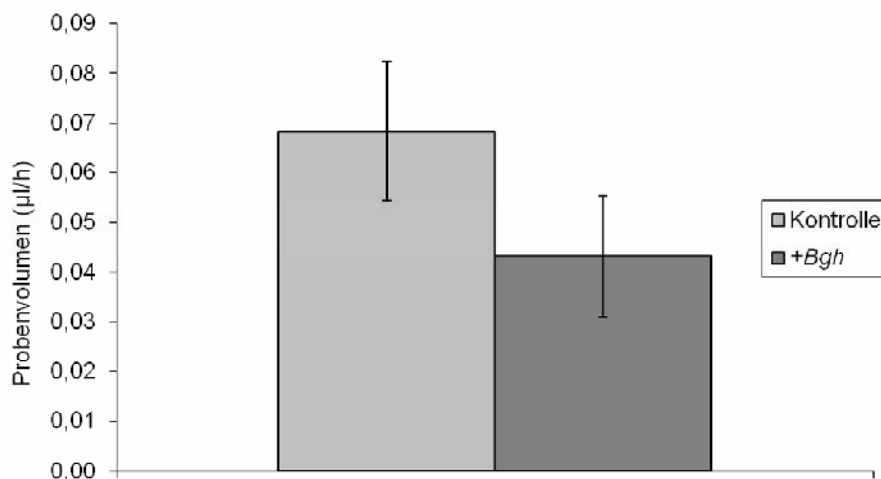
**Abb. 3.25:** Zweidimensionale Auftrennung und Fluoreszenzfärbung von Proteinen aus Stylektomieproben aus *Hv. cv. Pallas m/o5*. a) Kontrolle, 5µl Probenvolumen b) +*Bgh* 16-22hai, 5µl Probenvolumen, \*rot =P23K-3/4. Der Protein-Standard wird nicht durch den Fluoreszenzfarbstoff gefärbt. (n=2)

Das Experiment wurde deshalb mit einer reduzierten Probenmenge und einer Fluoreszenzfärbung wiederholt (Abb. 3.25, n=2). Auch hier konnte kein Unterschied zwischen der Kontrolle und den Proben aus inokulierten Pflanzen beobachtet

werden. Es stellte sich aber deutlich heraus, dass das Protein P23K-3/4 aus der Stylektomieprobe das quantitativ am stärksten exprimierte phloemspezifische Protein ist. In weiteren Versuchen wurden die Pflanzen 6h nach der Kauterisierung der Aphiden mit *Bgh* inokuliert. Ein Vergleich der Proben die zwischen 0-6h (Kontrolle) und 0-18hai aus identischen Stiletten gewonnen wurde, führte ebenfalls zu keinen signifikanten Unterschieden bezüglich einer Regulierung von P23K-3/4 nach Inokulation mit *Bgh*. Es besteht damit die Möglichkeit, dass die zur Probengewinnung eingesetzten Aphiden eine Hochregulierung von P23K-3/4 verursachen.

### 3.2.7 Verminderte Stilettexsudation nach Mehltaubefall und Brennreiz

Während der Probensammlung (Stylektomiemethode) aus *Bgh*-inokulierten Pflanzen war eine deutlich reduzierte Ausbeute bezüglich des Probenvolumens festzustellen. Durch eine Messung der Probenmenge, nach einer Exsudationszeit von 6h, mit Hilfe einer geeichten Glaskapillare, konnte aus den Pflanzen der Kontrolle (*Hv. cv. Pallas mlo5*, 21d) ein durchschnittliches Probenvolumen von 0,068 $\mu$ l/h und aus den inokulierten Pflanzen (*Hv. cv. Pallas mlo5*, 21d, 16-22hai) ein durchschnittliches Probenvolumen von 0,043 $\mu$ l/h bestimmt werden (Abb. 3.26, t-Test:  $P=0,003$ ). Dies entspricht einer verminderten Exsudationsrate von ca. 37% nach Mehltaubefall.



**Abb. 3.26:** Bestimmung des Probenvolumens, das aus exsudierenden Blattlausstiletten über einen Zeitraum von 6h nach Abtrennung der Mundwerkzeuge gewonnen wurde. Angegeben ist das durchschnittliche Probenvolumen je funktionelles Stilett/h aus der Kontrolle (helle Balken, 7 Versuchsansätze, 43 ausgewertete Stilette) und *Bgh* inokulierten Gerstenpflanzen (*Hv. cv. Pallas mlo5*, 21d). (dunkle Balken, 8 Versuchsansätze, 53 ausgewertete Stilette) t-Test:  $p=0,003$

Ein starker Stressreiz durch Anbrennen der Blattspitzen des Stylektomieansatzes in ca. 4-8cm Abstand zur Probenentnahmestelle führte zu einem dauerhaften

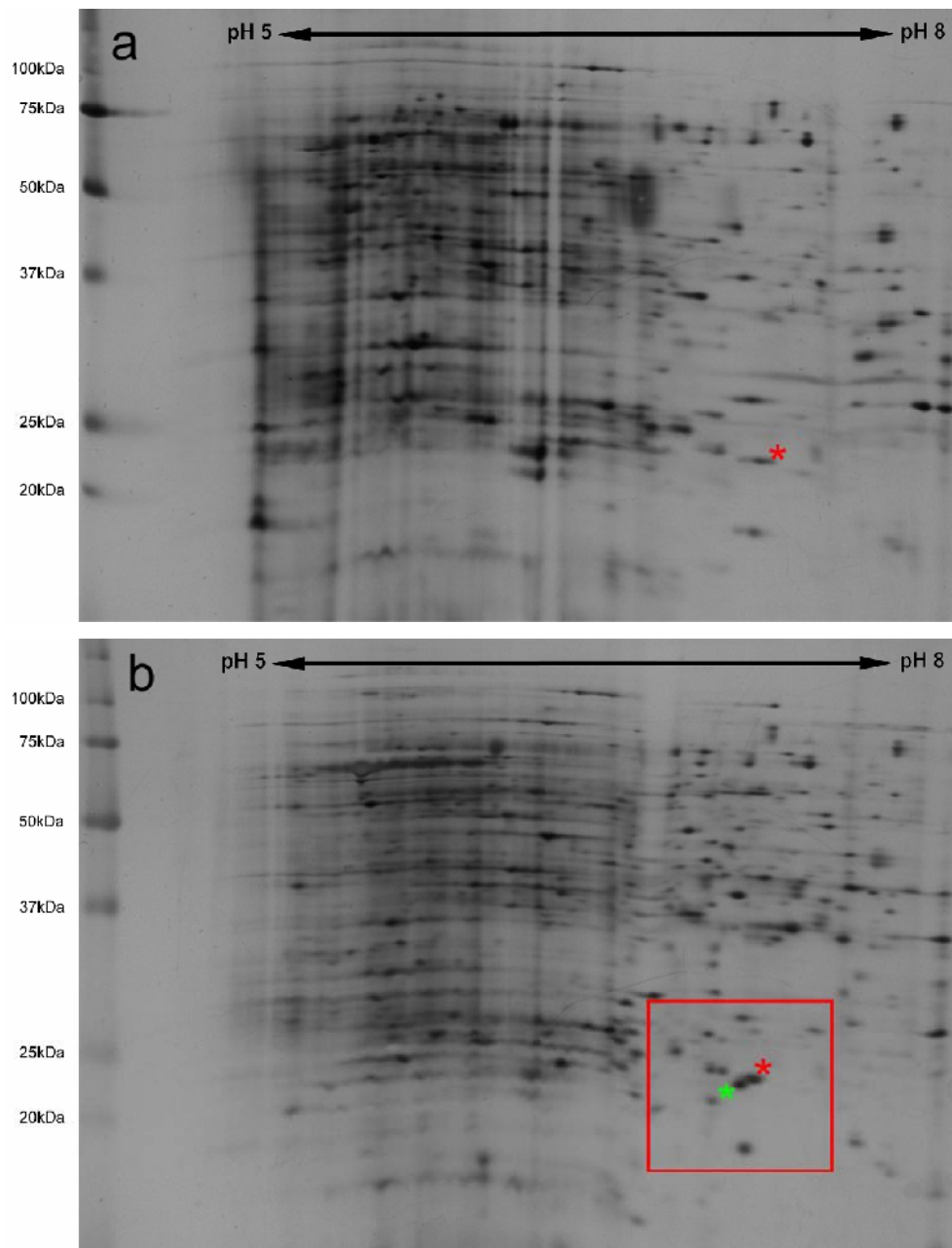
Verschluss der exsudierenden Stilette innerhalb von 5 min. Dieser Stressreiz wurde ebenfalls mit der EDTA-Methode untersucht (siehe 3.2.13). Eine Reduzierung der phloemspezifischen Probenmenge aus den inokulierten Pflanzen war, gegenüber der Kontrolle, mit der EDTA-Methode nicht zu beobachten.

### 3.2.8 Einfluss von Aphiden (*R.padi*) auf P23K-3/4

Aufgrund der mit Hilfe der Stylektomiemethode nicht reproduzierbaren Ergebnisse, bezüglich einer Hochregulierung von P23K-3/4 nach Inokulation mit *Bgh* und der auffällig hohen Proteinmenge von P23K-3/4 aus Stylektomieproben, wurde ein möglicher Einfluss von *R.padi*-Befall der Gerste auf das Protein untersucht. Durch den auffällig hohen Anteil von P23K-3/4 in allen Stylektomieproben, sollte auch eine Hochregulierung des Proteins nach Aphiden-Befall mit Hilfe der EDTA-Methode nachweisbar sein. 16-22h nach Befall mit *R.padi* (3000-4000 Blattläuse/64 Gerstenpflanzen) ergab die Auftrennung der EDTA-Probe einen neuen Proteinspot in direkter Nähe zu P23K-3/4 (Abb. 3.27).

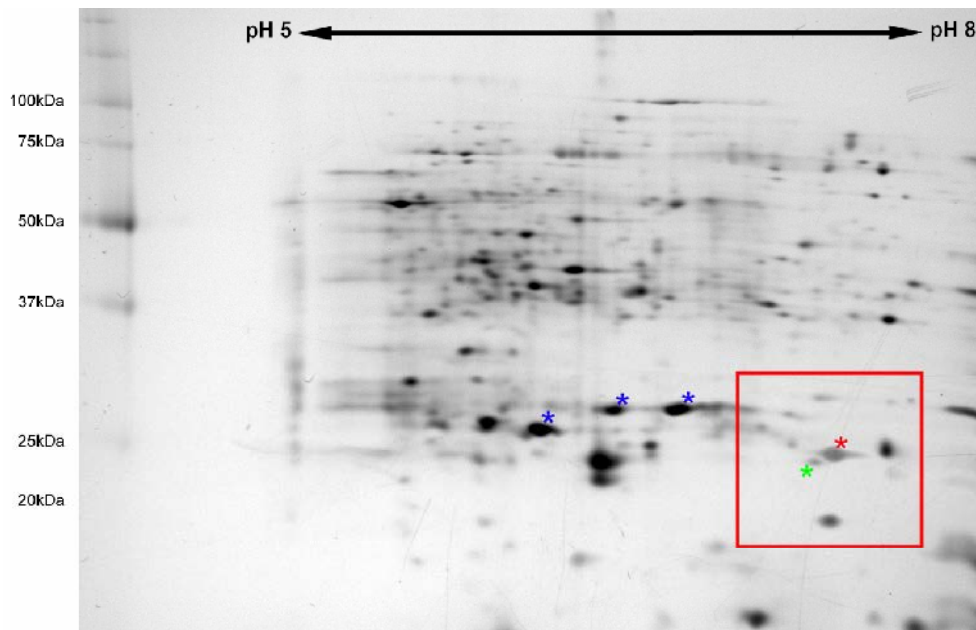
Durch die räumliche Nähe und die damit verbundene gegenseitige Kontaminierung der einzelnen Proteinspots erschien ein Ausstanzen der einzelnen Spots für eine massenspektrometrische Untersuchung nicht geeignet. Aufgrund einer leichten Verschiebung von P23K-3/4 aus Stylektomieproben in den sauren Bereich des Proteingels (vergleiche Abb. 3.7) war es jedoch sehr wahrscheinlich, dass der neue Proteinspot ebenfalls das Protein P23K-3/4 darstellt. Eine unterschiedliche Position im zweidimensionalen Gel ist eventuell durch posttranslationale Modifikationen (siehe 3.2.10) zu erklären. Zur Überprüfung sollte eine Mischung von P23K-3/4 aus der EDTA-Probe und P23K-3/4 aus der Stylektomieprobe nach einer gemeinsamen zweidimensionalen Auftrennung den charakteristischen Doppelspot der EDTA-Probe mit *R.padi*-Befall ergeben. Dazu wurden 5µl Stylektomieprobe (ohne Behandlung der Pflanzen) und 200µl des eingeeengten 2,5mM EDTA-Mediums (ohne Waschschrift, siehe 2.7) und ebenfalls ohne Behandlung der Pflanzen vereinigt und wie unter 2.7 beschrieben weiterverarbeitet. Die resultierenden Positionen in der Proteintrennung entsprachen exakt dem Muster, das durch *R.padi*-Befall im EDTA-Experiment erzeugt wurde. Im Gegensatz zum P23K-3/4 Spot ist in der Auftrennung außerdem eine deckungsgleiche Trennung und dadurch eine erhöhte Intensität der verwendeten Referenzspots zu erkennen (Abb. 3.28).





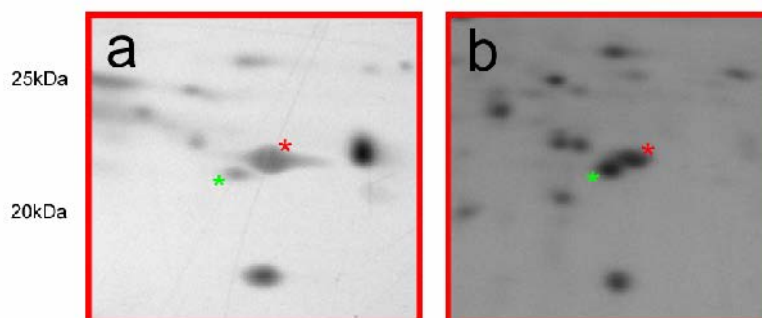
**Abb. 3.27:** Zweidimensionale Auftrennung von Proteinen aus EDTA-Proben (*Hv. cv. Pallas mlo5*). a) Kontrolle b) 16-22h nach Befall mit *R.padi* der 2., 3. und 4. Blätter. Eine Hochregulierung nach *Bgh*-Befall konnte zuvor für P23K-3/4 (\*rot) ermittelt werden. Nach Befall mit *R.padi* konnte ein neuer Proteinspot (\*grün) im Gel festgestellt werden. Eine Ausschnittvergrößerung ist in Abb. 3.29 dargestellt.





**Abb. 3.28: Gemeinsame zweidimensionale Auftrennung einer EDTA- und Stylektomieprobe aus *Hv. cv. Pallas*. Die Intensität der Referenzproteine (\*blau) ist durch die deckungsgleiche Auftrennung erhöht. Das Protein P23K-3/4 aus der Stylektomieprobe (\*grün) und aus der EDTA-Probe (\*rot) trennt sich nicht deckungsgleich. Eine Ausschnittvergrößerung ist in Abb. 3.29 dargestellt.**

Nach einer Mischung der beiden Proben und gemeinsamer Verarbeitung ist allerdings eine deutliche Abschwächung des P23K-3/4 Spot (Abb. 3.28, Abb. 3.29a, \*grün) aus der Stylektomieprobe festzustellen (vgl. Abb. 3.25). Der P23K-3/4 Spot (Abb. 3.28, \*rot) aus der EDTA-Probe (unbehandelte Pflanzen) zeigt gleichzeitig eine erhöhte Intensität. Im Fall einer posttranslationalen Modifikation von P23K-3/4 aus Stylektomieproben ist diese möglicherweise nicht stabil.



**Abb. 3.29: Ausschnittvergrößerung aus Abb. 3.27b und Abb. 3.28. a) Die gemeinsame Proteinauftrennung des Proteins P23K-3/4 aus der Stylektomieprobe (\*grün) und des Proteins P23K-3/4 aus der EDTA-Probe (\*rot) resultiert in einem Doppelspot. b) Ein identischer Doppelspot von P23K-3/4 (\*grün, \*rot) lässt sich mit *R.padi* befallenen Gerstenpflanzen und anschließender Probengewinnung mit Hilfe der EDTA-Methode erzielen.**

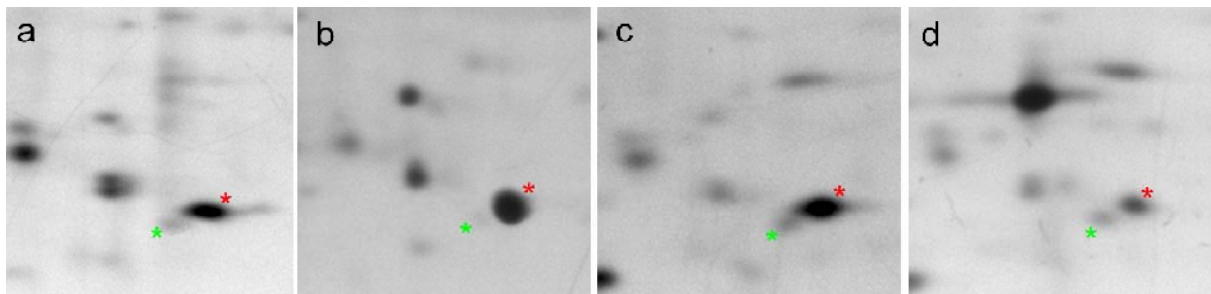
Eine zu P23K-3/4 (\*grün) deckungsgleiche Proteinartefakt aus den nicht konstanten Auftrennungsmustern der EDTA-Methode konnte in Abb. 3.28 ausgeschlossen

werden. In allen angefertigten Gelen ohne Befall der Versuchspflanzen mit *R.padi* konnte an der Position von P23K-3/4 (\*grün) im Gel kein identischer Spot registriert werden. Auch eine Verunreinigung mit Blattlausproteinen durch vereinzelt ins Exsudationsmedium gefallene Aphiden konnte durch den unter 3.2.9 beschriebenen Versuch ausgeschlossen werden.

### 3.2.9 Systemischer Einfluss von *Bgh* und *R.padi* auf P23K-3/4

Nachdem eine systemische Induzierung bzw. ein systemischer Transport von P23K-3/4 zwischen den inokulierten Blattspitzen bis zur Probenentnahmestelle gezeigt werden konnte, wurden ausschließlich die 2. Blätter der Versuchspflanzen inokuliert und vor der erleichterten Exsudation mit EDTA verworfen. Nach einer Inokulation mit *Bgh* konnte jedoch in diesen Versuchsansätzen (16-22hai und 40-46hai) keine eindeutige Hochregulierung von P23K-3/4 aus den Exsudaten der 3. und 4. Blätter nachgewiesen werden. Im Fall einer Abschwächung des Effektes mit zunehmender Reizentfernung lassen sich geringe Unterschiede zwischen der Kontrolle und den nur am 2. Blatt inokulierten Pflanzen, durch die relativ großen quantitativen Abweichungen der phloemspezifischen Referenzproteine, mit der EDTA-Methode nicht mehr eindeutig nachweisen.

Durch die Entstehung des unter 3.2.8 beschriebenen P23K-3/4 Doppelspots sollte eine systemische Verteilung oder Induzierung des Proteins in der gesamten Gerstenpflanze nach Befall des 2. Blattes mit *R.padi* überprüft werden. Der durch *R.padi* induzierte P23K-3/4 Spot bietet den Vorteil, dass er im Gegensatz zum *Bgh* induzierten P23K-3/4 Spot nicht konstitutiv exprimiert wird und daher kein Hintergrundsignal im Gel zeigt.



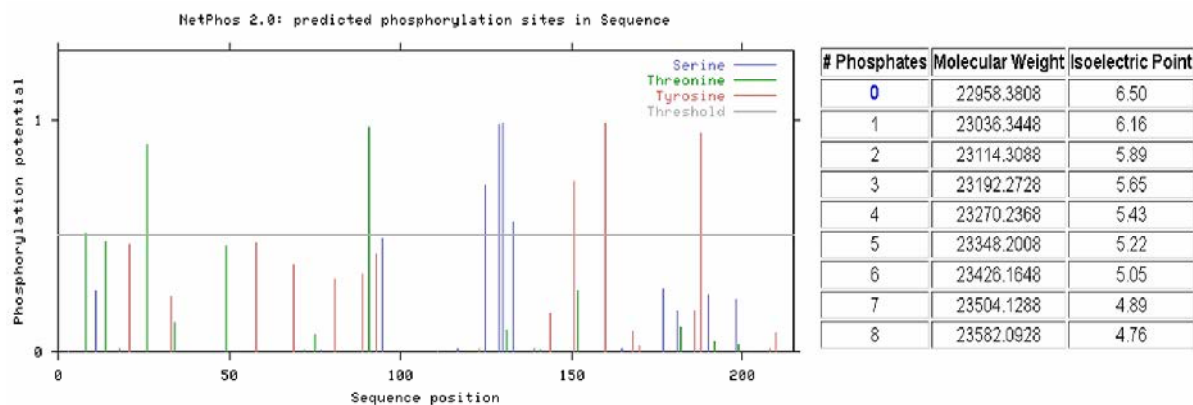
**Abb. 3.30:** Reproduktionen des P23K-3/4 Doppelspots nach Befall des 2. Blattes mit *R.padi*. a,b) Pallas 42-48h nach Befall mit *R.padi*, c) Pallas *mlo5* 42-48h nach Befall mit *R.padi*, d) Pallas *mlo5* 42-48hai (+*Bgh*) und 42-48h nach Befall mit *R.padi*). Das 2. Blatt wurde in allen Experimenten vor der Probenentnahme entfernt.

Analog zu den Versuchen mit *Bgh* inokulierten Pflanzen wurden die Aphiden (*R.padi*) ausschließlich auf das 2. Blatt der Versuchspflanzen gesetzt (jeweils ca. 300

Aphiden) und nach 42h inklusive den 2. Blättern wieder entfernt. Die 2. Blätter der Kontrolle wurden ebenfalls entfernt. Auch nach der erleichterten Exsudation mit EDTA der verbleibenden Pflanzenteile konnte der P23K-3/4 Doppelspot im Gel nachgewiesen werden. Damit ist zu erwarten, dass das Protein P23K-3/4 in den verbleibenden Blättern systemisch verteilt bzw. systemisch induziert worden ist. Insgesamt konnte der P23K-3/4 Doppelspot in 5 von 6 Experimenten reproduziert werden (Abb. 3.30). Auch nach Inokulation der gesamten Pflanze mit *Bgh* war eine Bildung des Doppelspots möglich (Abb. 3.30.d).

### 3.2.10 Posttranslationale Modifikationen

Eine Verschiebung des *R.padi* induzierten Spots (\*grün) in Richtung des sauren Bereichs während der IEF lässt sich eventuell durch posttranslationale Modifikationen von P23K-3/4 erklären. Mit Hilfe des Programms „NetPhos“ ([www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/](http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/)) lassen sich mögliche Phosphorylierungsstellen in der Aminosäuresequenz von P23K-3/4 identifizieren und mit Hilfe des Programms „Compute pI/Mw tool“ ([http://www.expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html)) der theoretische IEP nach Phosphorylierung des Proteins berechnen (Abb. 3.31).



**Abb. 3.31: Theoretisch ermittelte Phosphorylierungsstellen an Serin, Threonin und Tyrosinresten in der Aminosäuresequenz von P23K-3 und unterschiedliche Isoelektrische Punkte des Proteins P23K-3 nach Bindung von Phosphatresten.**

Für die Proteine P23K-3 und P23K-4 konnten identische IEP mit einem pH-Wert von 6,5 ermittelt werden. Nach der Bindung eines Phosphatrestes ändert sich der theoretische IEP auf einen pH-Wert von 6,16. Dies entspricht in den verwendeten IPG-Gelen (pH5-8; Länge 7cm) einer horizontalen Verschiebung von ca. 2,3mm. Dieser Wert entspricht den im Proteingel ermittelten Abstand der beiden P23-K3/4 Proteinspots von ca. 2mm.

### 3.2.11 Jasmonsäuremethylester Behandlung

Aufgrund der 87% Übereinstimmung der Aminosäuresequenz (Abb. 3.16) von P23K-3/4 zum 23kDa Jasmonat induzierten Protein (JIP-23) sollte eine eventuelle Reaktion von P23K-3/4 nach Behandlung der Pflanzen mit 100µM Methyljasmonat untersucht werden. In Proteingelen aus EDTA-Proben konnte keine signifikante Änderung von P23K-3/4 zu den Zeitpunkten 16-22h und 42-48h nach Behandlung festgestellt werden.

### 3.2.12 DCINA Behandlung

Um P23K-3/4 in einen Pathogenrelevanten Signalweg einzuordnen, sollte mit Hilfe der EDTA-Methode eine mögliche Regulierung des Proteins nach Behandlung der Versuchspflanzen mit dem chemischen Resistenzinduktor Dichlorisonikotinsäure (DCINA) überprüft werden.

In den mit 10ppm DCINA behandelten Gerstenpflanzen konnte eine sehr niedrige Konzentration von P23K-3/4 nach 12-18h (Abb. 3.32, 3.33) und 24-30h (Abb. 3.34, 3.35) nach Behandlung festgestellt werden, was auf eine Runterregulierung des Proteins hindeutet.

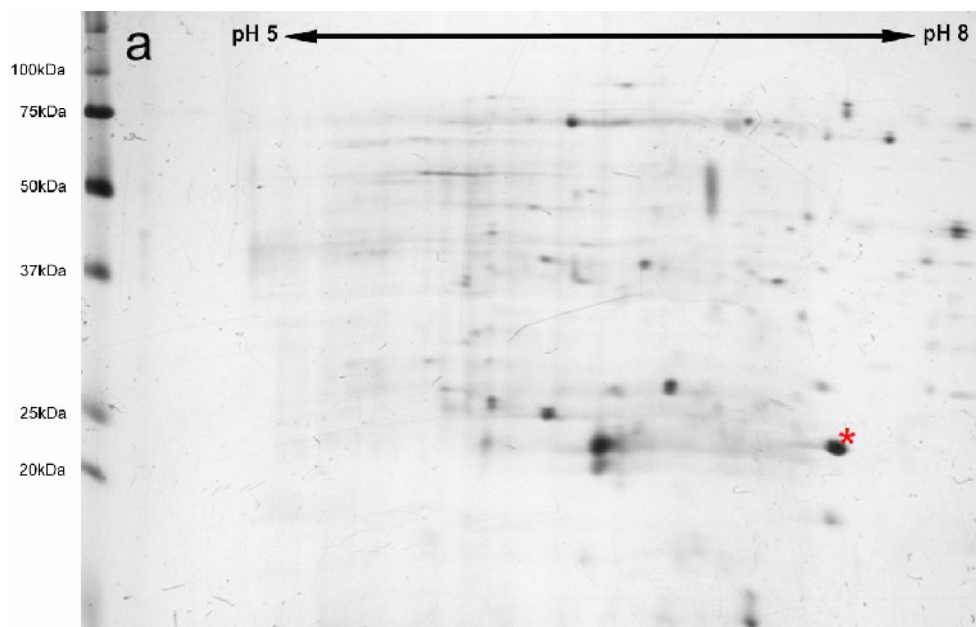
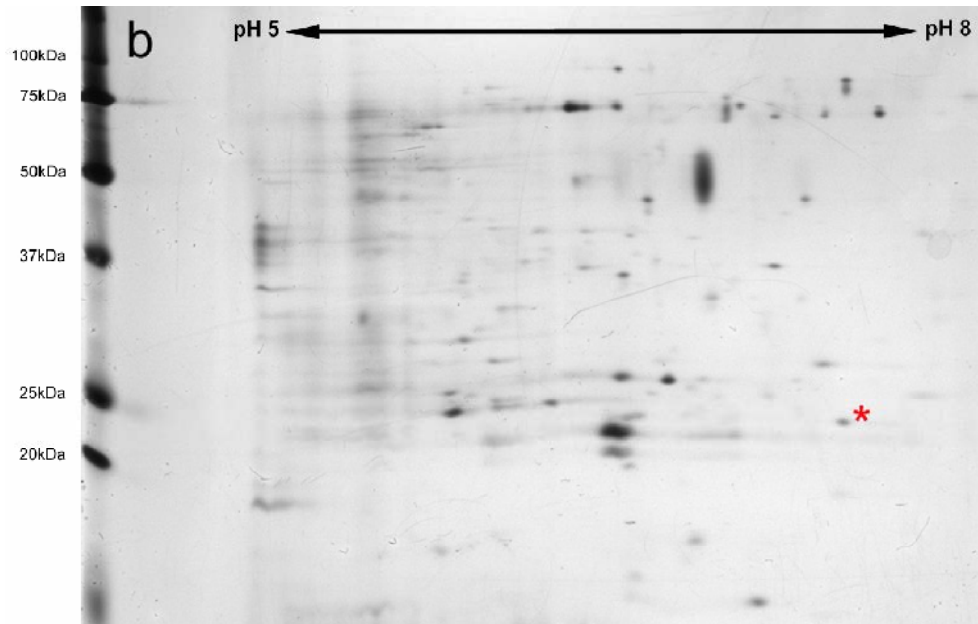
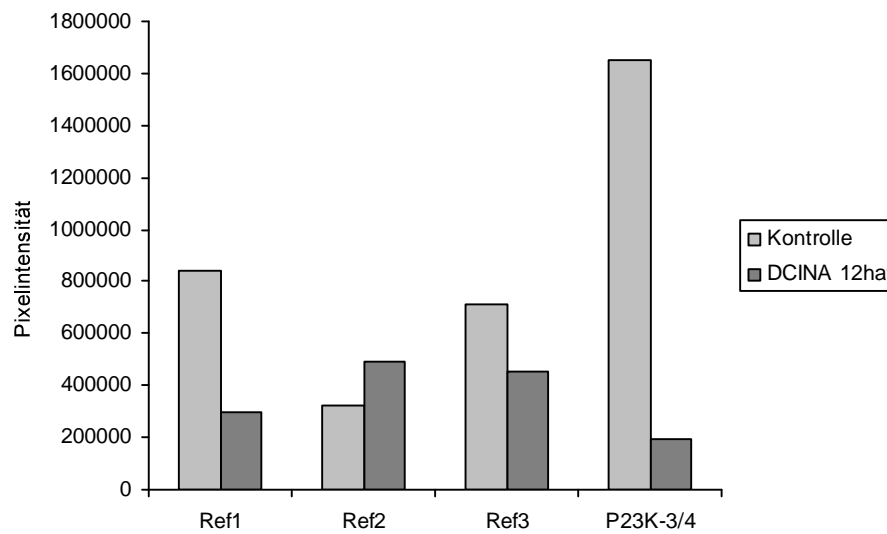


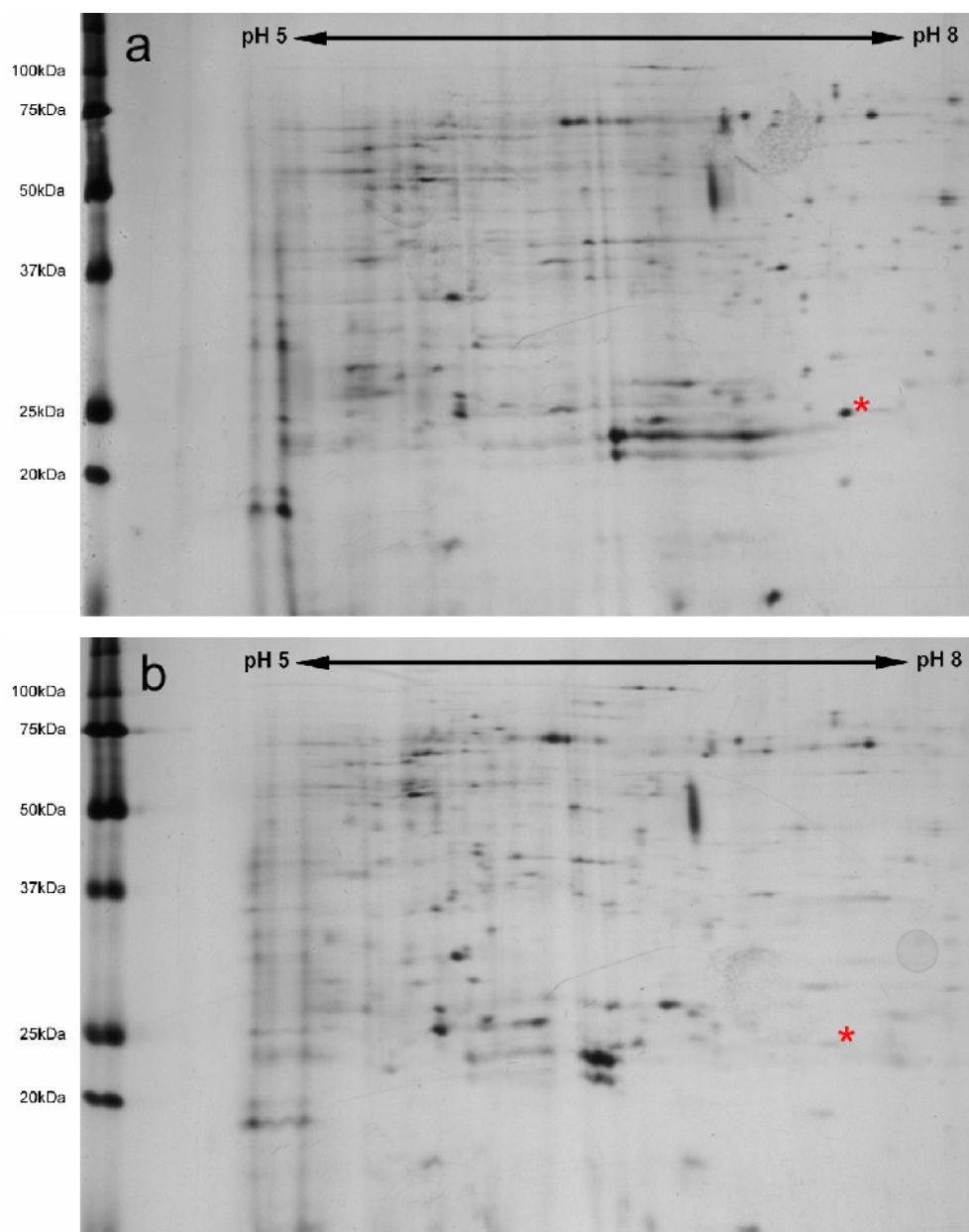
Abb. 3.32 (siehe Seite 63)



**Abb. 3.32:** Zweidimensionale Auftrennung und Silberfärbung von Proteinen aus EDTA-Proben (*Hv. cv. Pallas*). a) Kontrolle b) 12-18h nach Behandlung mit DCINA.

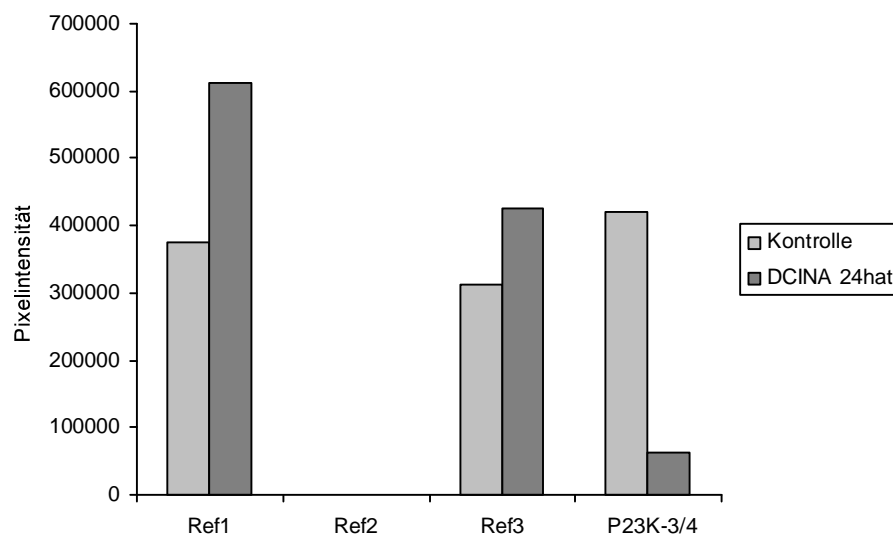


**Abb. 3.33:** Quantifizierung der Referenzspots (Ref1-3) und des Proteins P23K-3/4 aus der Kontrolle und mit DCINA (12-18hat) behandelten Pflanzen. Die entsprechenden Proteinauftrennungen sind in Abb. 3.32 dargestellt.



**Abb. 3.34: Zweidimensionale Auftrennung und Silberfärbung von Proteinen aus EDTA-Proben (*Hv. cv. Pallas*).**  
a) Kontrolle b) 24-30h nach Behandlung mit DCINA.





**Abb. 3.35: Quantifizierung der Referenzspots (Ref1,3) und des Proteins P23K-3/4 aus der Kontrolle und mit DCINA (24-30hat) behandelten Pflanzen. Die entsprechenden Proteinauftrennungen sind in Abb. 3.34 dargestellt.**

### 3.2.13 Brennreiz

Der Brennreiz ist ein gängiges Mittel zur Auslösung von Stresssignalen in Pflanzen. Aufgrund der unter 3.2.7 beschriebenen Beobachtungen sollte seine Wirkung auf eine Regulierung von P23K-3/4 zu den Zeitpunkten 3-9h und 16-22h mit Hilfe der EDTA-Methode untersucht werden. Nach dem Anbrennen des jeweils letzten Drittels, der 2., 3. und 4. Blätter, konnte mit Hilfe der EDTA-Methode keine Änderung von P23K-3/4 gegenüber der Kontrolle festgestellt werden (Abb. 3.36, 3.37).

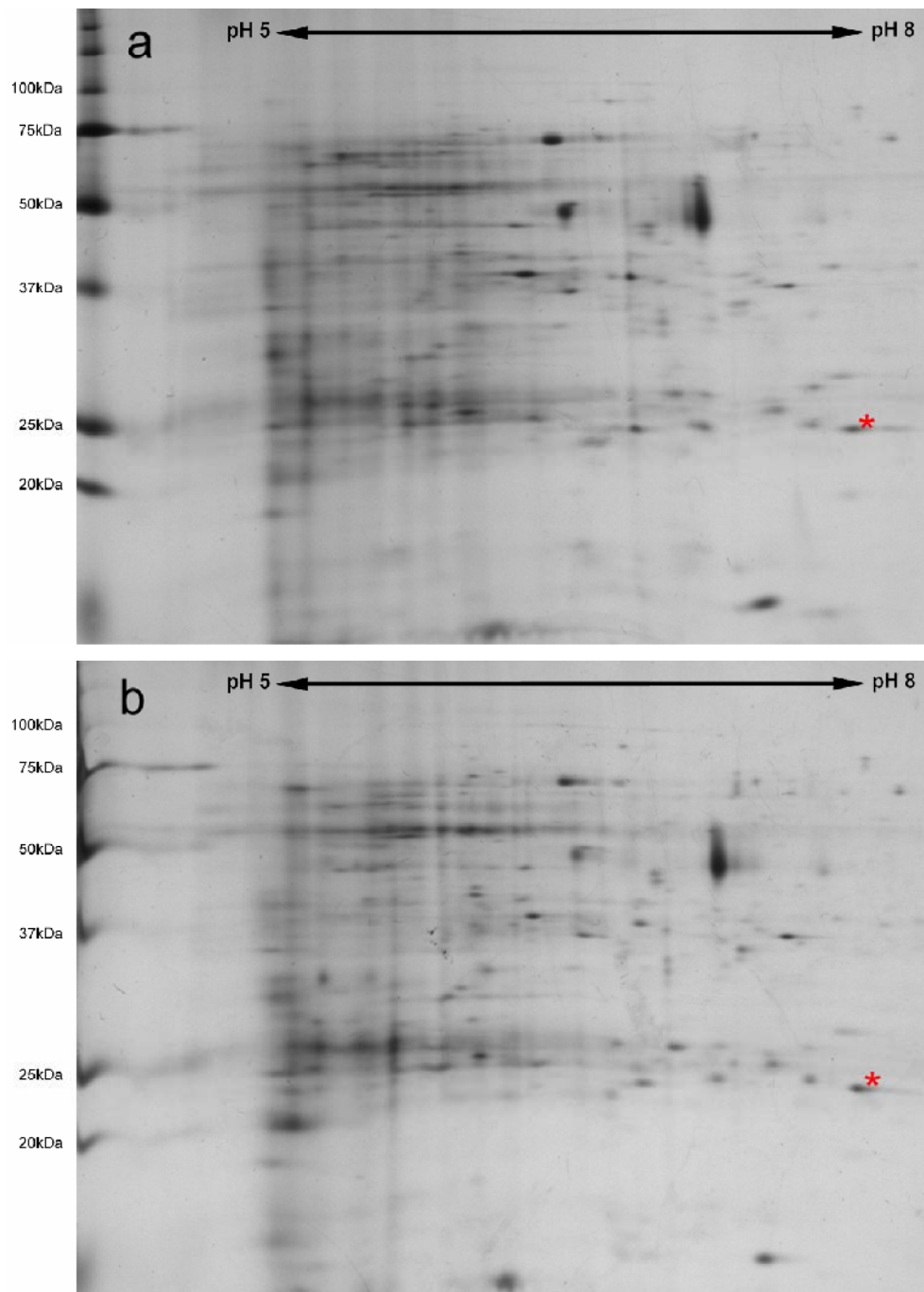
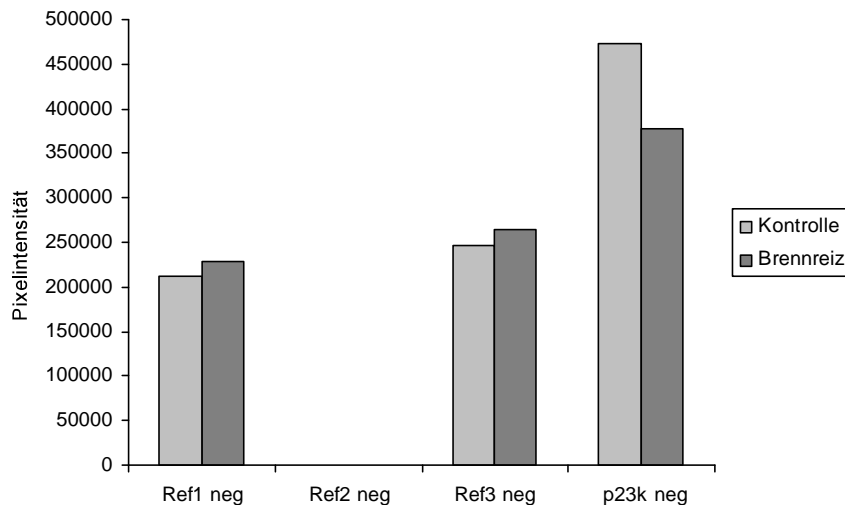


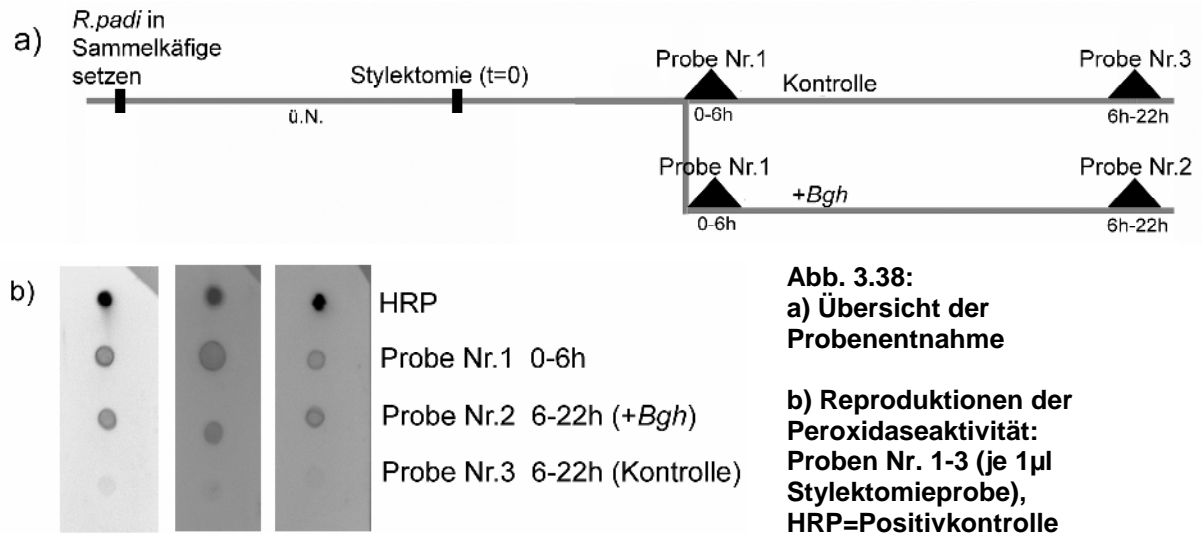
Abb. 3.36: Zweidimensionale Auftrennung und Silberfärbung von Proteinen aus EDTA-Proben (*Hv. cv. Pallas*). a) Kontrolle b) 3-9h nach Anbrennen der Blattspitzen. (n=2)



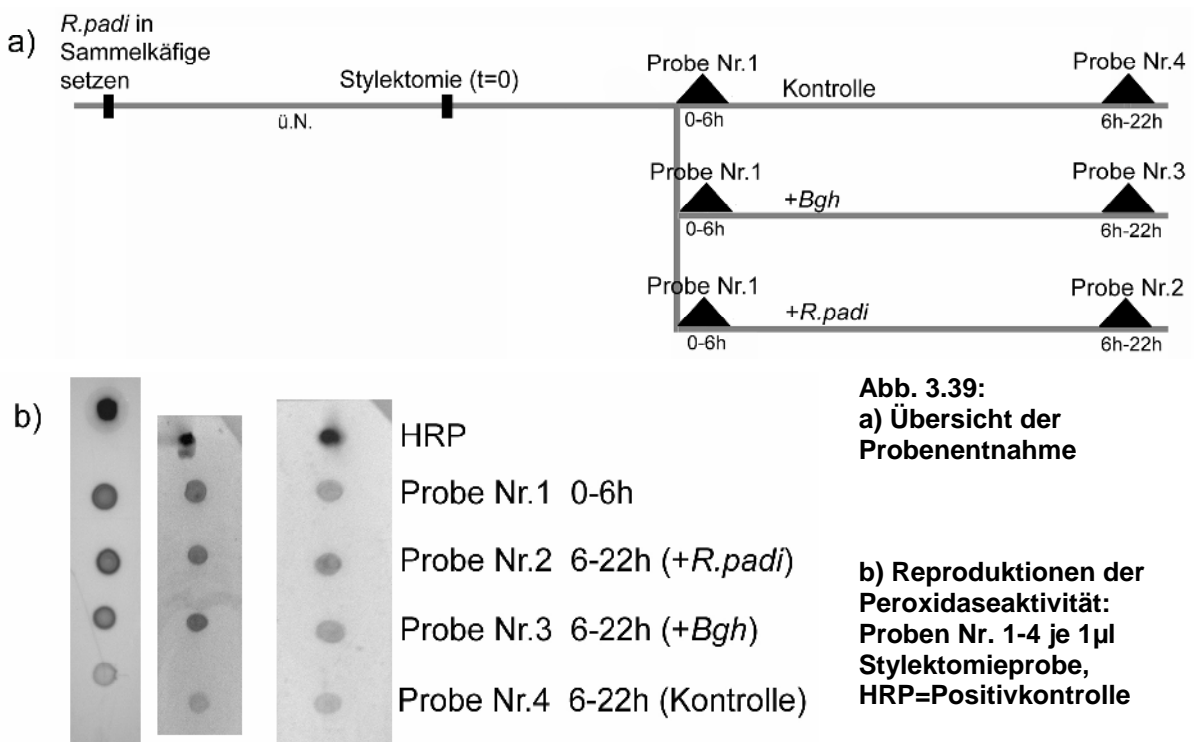
**Abb. 3.37: Quantifizierung der Referenzspots (Ref1 und Ref3) und des Proteins P23K-3 aus der Kontrolle und 3-9h nach Anbrennen der Blattspitzen. Die entsprechenden Proteinauftrennungen sind in Abb. 3.37 dargestellt. (n=2)**

### **3.2.14 Messung der Peroxidaseaktivität in Stylektomieproben aus Gerste nach Inokulation mit *Bgh* und Befall mit *R.padi***

Peroxidasen sind häufig am Aufbau und Verstärkung der sekundären Zellwand beteiligt und gelten neben anderen Enzymen als Quelle für die  $H_2O_2$ -Produktion in Pflanzen (Blee et al. 2001, Bolwell et al. 2002).  $H_2O_2$  wird häufig in Zusammenhang mit Stressantworten von Pflanzen diskutiert. Aufgrund von Literaturhinweisen (Alvarez et al. 1998, Karpinski et al. 1999, Foyer et al. 2005) sollte insbesondere ein systemischer Effekt auf die Peroxidaseaktivität im Siebröhrensaft der Gerste (bzw. in Stylektomieproben) nach Inokulation mit *Bgh* untersucht werden. Die Probenentnahme mittels Stylektomie erfolgte dazu auf dem 3. Blatt der Pflanzen, während ausschließlich das 2. Blatt mit *Bgh* inokuliert wurde. Aus den Siebelementsäften, die 0-6h nach dem Kauterisieren der Aphidenstilette (ohne Inokulation mit *Bgh*) gewonnen wurden, ließen sich keine Proben ohne erhöhte Peroxidaseaktivität gewinnen (Abb. 3.38, Probe Nr.1). Dies spricht für eine lokale Induktion der Peroxidaseaktivität an der Probenentnahmestelle. Nach einer Inokulation des 2. Blattes mit *Bgh* konnte nach erneuter Probenentnahme (0-16hai) eine anhaltende Erhöhung der Peroxidaseaktivität festgestellt werden (Abb. 3.38, Probe Nr.2), während in den Proben der Kontrolle eine Verminderung der Peroxidaseaktivität beobachtet werden konnte (Abb. 3.38, Probe Nr.3).



Aufgrund der lokalen Induktion der Peroxidaseaktivität an der Probenentnahmestelle, die 0-6h nach Kauterisierung der Aphiden aus unbehandelten Pflanzen gewonnen wurden (Abb. 3.38 und 3.39, Probe Nr.1), sollte analog zu der Inokulation mit *Bgh* (Abb. 3.39, Probe Nr.3) auch ein systemischer Effekt der Blattläuse untersucht werden. Nach einem massiven Befall des 2. Blattes (ca. 300 Aphiden) konnte ebenfalls eine Erhöhung der Peroxidaseaktivität im 3. Blatt ermittelt werden (Abb. 3.39, Probe Nr.2). Die Peroxidaseaktivität der Kontrolle (Abb. 3.39, Probe Nr.4) zeigte eine niedrige Aktivität.



Um genauere Informationen über den zeitlichen Verlauf der Peroxidaseaktivität nach Inokulation mit *Bgh* zu erhalten, wurde die Probenentnahme in 8h Zeitabschnitte unterteilt (Abb. 3.40a). Auch hier wurde eine erhöhte Peroxidaseaktivität nach der Kauterisierung bzw. der Entfernung der Aphiden ermittelt (Abb. 3.40, Probe Nr.1, 2, Probenentnahme 0-8h). Nach einer weiteren Probenentnahme (8-16h) ohne Behandlung der Pflanzen konnte eine Verminderung der Peroxidaseaktivität ermittelt werden (Abb. 3.40, Probe Nr.3, 4). Nach 16h erfolgte die Inokulation des 2. Blattes mit *Bgh*, die in einer erhöhten Peroxidaseaktivität in der 16-24h Probe resultierte (Abb. 3.40, Probe Nr.6). In den Proben der Kontrolle war dagegen eine weitere Abnahme der Peroxidaseaktivität zu beobachten (Abb. 3.40, Probe Nr.5).

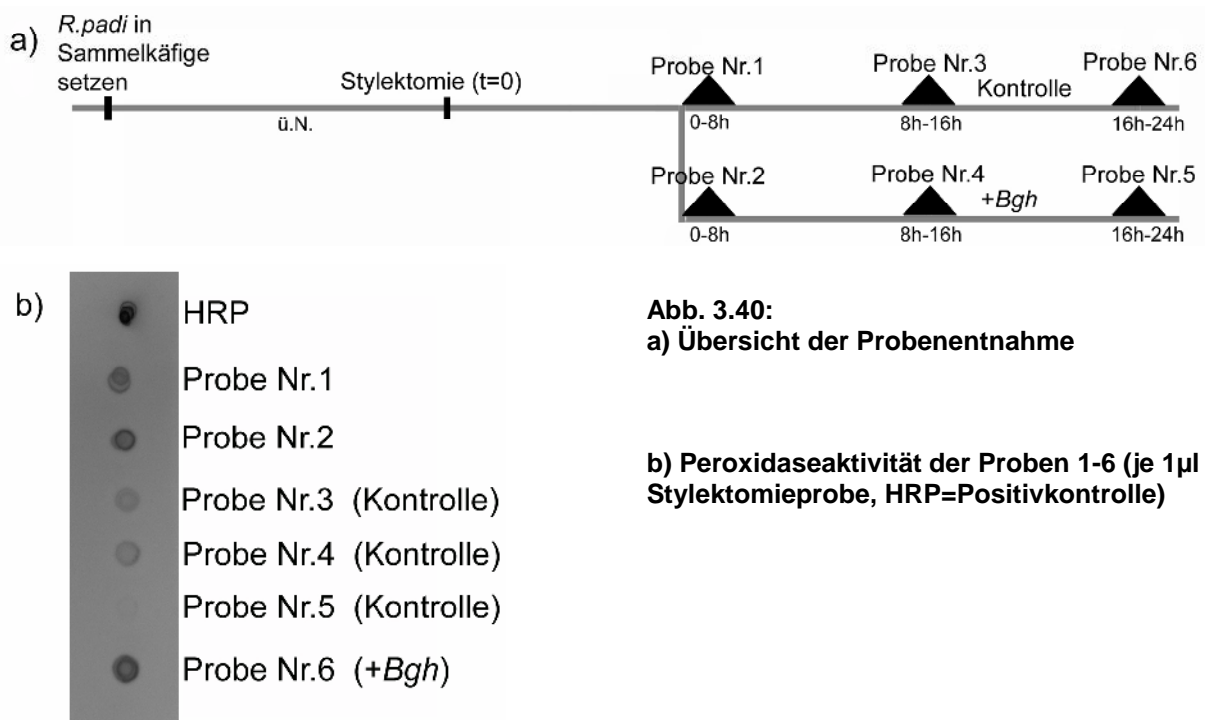


Abb. 3.40:

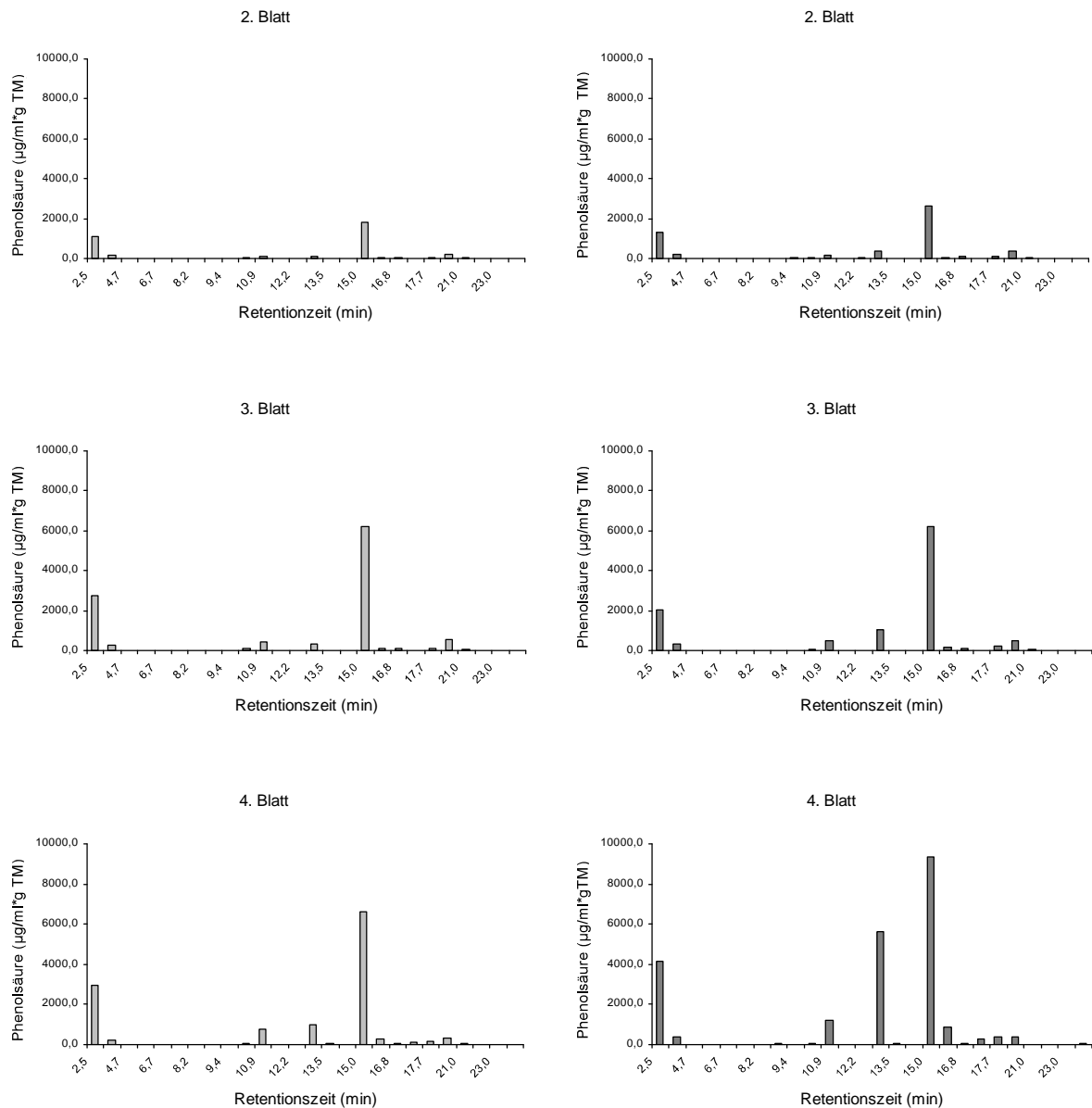
a) Übersicht der Probenentnahme

b) Peroxidaseaktivität der Proben 1-6 (je 1µl Stylektomieprobe, HRP=Positivkontrolle)

### 3.2.15 Bestimmung der löslichen Phenolsäuren in Gerste nach Befall mit *Bgh*

Nachdem eine systemische Hochregulierung der Peroxidaseaktivität und eine systemische Induzierung bzw. Verteilung von P23K-3/4 ermittelt wurden, sollte auch die systemische Induzierung von löslichen Phenolsäuren bestimmt werden. Nach einer ausschließlichen Inokulation des 2. Blattes konnte im 4. Blatt ein erhöhtes Signal der Phenolsäure mit einer Retentionszeit von 13min festgestellt werden. Ebenso zeigte die Phenolsäure mit einer Retentionszeit von 15min eine Konzentrationserhöhung gegenüber der Kontrolle. Die Ergebnisse wurden nicht

reproduziert, weil keine entsprechenden Standardsubstanzen für die Identifizierung der Phenolsäuren verfügbar waren.

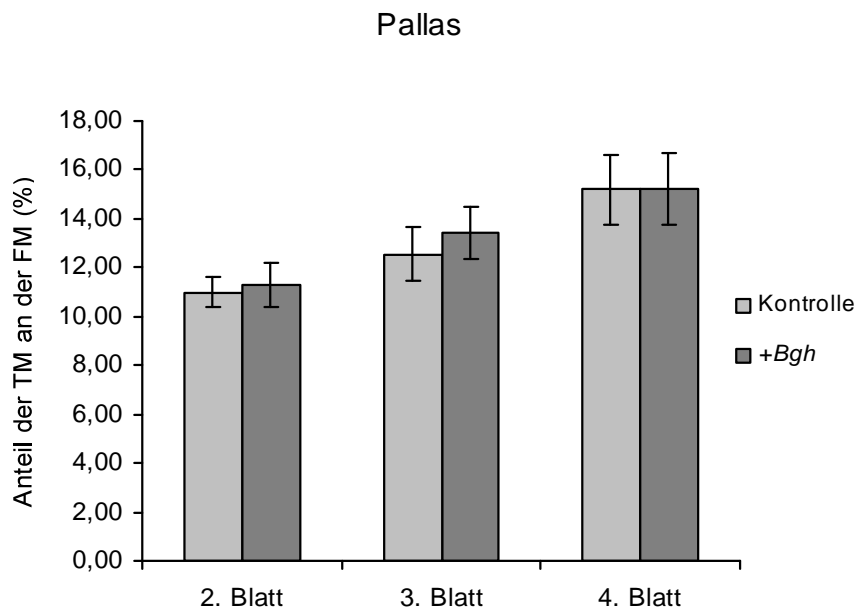


**Abb. 3.41: Bestimmung der löslichen Phenolsäuren aus dem 2.,3. und 4. Blatt der Gerste (*Hv. cv. Pallas mlo5*) nach Inokulation des 2. Blattes mit *Bgh*. Dargestellt sind die Anteile der löslichen Phenolsäuren aus den Pflanzen der Kontrolle (helle Balken) und die löslichen Phenolsäuren der auf dem 2. Blatt inokulierten Pflanzen (dunkle Balken).**



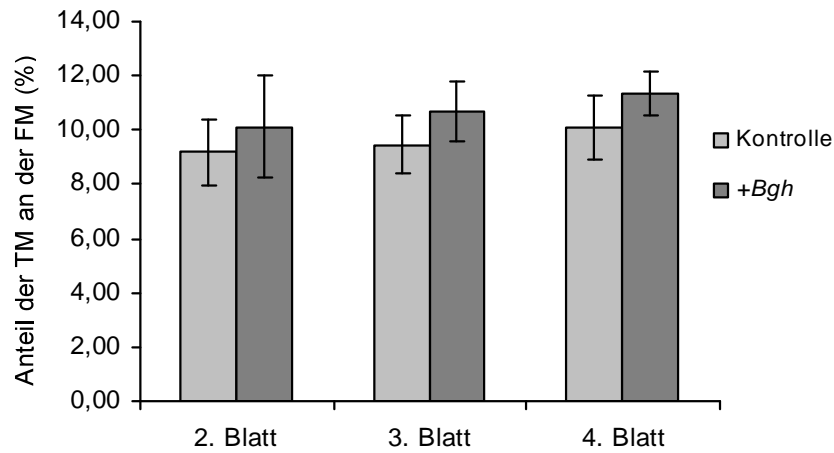
### 3.2.16 Bestimmung der Zellwandmasse nach Befall mit *Bgh*

Aufgrund von Literaturhinweisen (Oikawa et al. 2009) über Defekte während der Bildung der sekundären Zellwand nach einem VIGS (*virus induced gene silencing*) von P23K sollte der Einfluss von *Bgh* auf den prozentualen Zellwandanteil, bezogen auf die Frischmasse der Pflanzen, ermittelt werden. Dabei wurde nur das 2. Blatt der Gerstenpflanzen mit *Bgh* inokuliert und der Zellwandanteil der 2., 3. und 4. Blätter 48hpi ausgewertet. Im 3. und 4. Blatt von Pallas *mlo5* konnte 48hpi eine signifikante Erhöhung (t-Test: 3. Blatt  $P=0,004$ , 4. Blatt  $P=0,001$ ) des Zellwandanteils von 11% gegenüber der Kontrolle ermittelt werden (Abb.3.43), während im Kultivar Pallas die Veränderungen des Zellwandanteils weniger stark und nicht signifikant ausgeprägt waren (Abb. 3.42). Die Experimente wurden in 5 Wiederholungen mit je 3 Pflanzen durchgeführt.



**Abb. 3.42: Prozentuale Anteile der Trockenmasse (TM) an der Frischmasse (FM) der 2.,3. und 4. Blätter (*Hv. cv. Pallas*) nach Inokulation des 2. Blattes mit *Bgh*. (t-Test: 2.Blatt  $P=0,188$ ; 3. Blatt  $P=0,151$ ; 4. Blatt  $P=0,952$ )**

Pallas *m/o5*



**Abb. 3.43: Prozentuale Anteile der Trockenmasse (TM) an der Frischmasse (FM) der 2.,3. und 4. Blätter (*Hv. cv. Pallas m/o5*) nach Inokulation des 2. Blattes mit *Bgh* (t-Test: 2.Blatt  $P=0,056$ ; 3. Blatt  $P=0,004$ ; 4. Blatt  $P=0,001$ ). Verglichen mit der Kontrolle konnte im 3. und 4. Blatt eine Erhöhung von 11% der TM 48h nach Inokulation mit *Bgh* ermittelt werden.**

## 4 Diskussion

### 4.1 Etablierung der EDTA- und Stylektomiemethode zur phloemspezifischen Probenentnahme aus *Hordeum vulgare*

Mit Hilfe einer Analyse von phloemspezifischen Proben der Gerste nach Mehltaubefall sollten neue Erkenntnisse über mögliche systemische Signale zur Pathogenabwehr von *Bgh* gewonnen werden. Der Schwerpunkt der Arbeit lag auf der Veränderung der Proteinzusammensetzung im Siebröhrensaft der Gerste nach Befall mit *Bgh*. Im methodischen Teil der Arbeit sollten zunächst die erleichterte Exsudation mit EDTA und die Aphidenstylektomie, zur Gewinnung von phloemspezifischen Proben aus Gerste, etabliert und verglichen werden.

#### 4.1.1 Vergleich der Probeentnahmetechniken mittels SDS-PAGE

Die erleichterte Exsudation mit EDTA sollte als Alternativmethode, zur bereits ausführlich beschriebenen Probenentnahme mittels Stylektomie aus Getreide (Fukumorita und Chino 1982, Fisher und Frame 1984, Hayashi und Chino 1985), etabliert werden. Die Vorteile der EDTA-Methode liegen in der einfachen Anwendung und einem experimentellen Zeitvorteil für die Probengewinnung. Ebenso können Signale durch Aphiden ausgeschlossen werden, die eventuell *Bgh* induzierte Signale überlagern. Durch das Abschneiden der Pflanzen für die erleichterte Exsudation ist aber auch hier mit Wundsignalen zu rechnen, die möglicherweise mit *Bgh* induzierten Veränderungen im Siebröhrensaft interagieren. In der EDTA-Probe wurde vor allem durch die hohe Anzahl der angeschnittenen Zellen und den damit freigelegten Zellmembranen mit einer großen Anzahl von nicht phloemspezifischen Proteinen im Exsudationsmedium gerechnet. Die Fläche der beschädigten Zellen liegt in Abhängigkeit von der verwendeten Pflanzenanzahl in einem Bereich von einigen Quadratmillimetern bis zu einer Fläche im Quadratzentimeterbereich im Fall einer Probenentnahme für die zweidimensionale Gelelektrophorese. Zusätzlich ist mit einer plasmamembranschädigenden Wirkung von EDTA zu rechnen (Pate 1980, Girousse et al. 1991), sodass weitere Proteine aus den Membranen der angeschnittenen Zellen freigesetzt werden. Ebenso werden, trotz einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre während der Probengewinnung, große Mengen der EDTA-Lösung durch das Xylem aufgenommen. Hierbei ist nicht geklärt, ob und in welchem Umfang das aufgenommene EDTA in die Siebröhren transportiert wird. Im

Phloem könnte eine membranschädigende Wirkung von EDTA parietale Phloemproteine ablösen, die trotz ihrer Phloemspezifität als Artefakte im Exsudationsmedium anzusehen sind. Mit einer Exsudation der Pflanzen ohne EDTA im Exsudationsmedium und den entsprechend fehlenden Proteinbanden (Abb. 3.1) konnte bestätigt werden, dass ein Großteil der Proteinartefakte der EDTA-Methode nicht auf ein Leck der Proteine aus den angeschnittenen Zellen zurückzuführen sind. Wahrscheinlicher ist, dass EDTA im Laufe der mehrstündigen Probenentnahme die freigelegten Zellmembranen beschädigt und dadurch membrangebundene Proteine ins Exsudationsmedium freigesetzt werden. Trotzdem wurde bei allen Exsudationen mit EDTA die Probe der ersten Stunde verworfen. In diesem Zeitabschnitt der Probenentnahme wurde mit dem höchsten Anteil von Proteinverunreinigungen gerechnet, die auf ein einfaches Leck von Proteinen zurückzuführen sind. Abweichend vom Originalprotokoll von King und Zeevaart (1974) wurde schließlich eine EDTA-Konzentration von 5mM während des Schneidens bzw. von 2,5mM während der Probensammlung als ausreichend für die Gewinnung von Phloemproben beurteilt. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits zuvor von verschiedenen Autoren während der Probensammlung mit der EDTA-Methode gemacht (Weibull et al. 1990, van Bel et al. 1994, Liu et al. 2012).

Besonders auffällig war der hohe Anteil von hochmolekularen Proteinen im Gel, die mit Hilfe der EDTA-Methode gewonnen wurden (Abb. 3.1, 3.3). In Proben, die mit Hilfe der Stylektomiemethode aus Weizen und Reis gewonnen wurden, lässt sich ein Molekulargewicht zwischen 10kDa und 50kDa für den Großteil der Proteine ermitteln (Schobert et al. 1998). Diese Werte stimmen mit den ermittelten Molekulargewichten der Stylektomieprobe aus Gerste gut überein (Abb. 3.2, 3.3). In seltenen Fällen können die exsudierenden Stilette bis zu 3 Tage Siebröhrensaft liefern. Die Auftrennung dieser Proben ergibt in der SDS-PAGE ein sehr stabiles Bandenmuster, obwohl der Siebröhrensaft bis zu 24h bei Raumtemperatur unter Silikonöl verblieb (Abb. 3.2). In den Proben, die 24h nach Abtrennung der Stilette gewonnen wurden, lässt sich lediglich eine Abnahme der Proteinkonzentration feststellen, jedoch keine zusätzlichen Proteinbanden im niedermolekularen Bereich (Abb. 3.2). Anhand dieser Ergebnisse ist mit einer sehr geringen oder nicht vorhandenen Proteaseaktivität im Siebröhrensaft der Gerste zu rechnen. Außerdem wurden bereits Proteaseinhibitoren im Siebröhrensaft von verschiedenen Pflanzenspezies detektiert (Kehr 2006). Auch eine von Aphiden induzierte Expression von Proteaseinhibitoren in Gerste konnte

bereits nachgewiesen werden (Casaretto und Corcuera 1998), allerdings gibt es derzeit keine phloemspezifischen Untersuchungen in Gerste. Aufgrund der hohen Anzahl angeschnittener Zellen ist in der EDTA-Probe mit einer höheren Kontaminierung von Proteasen auszugehen. Durch die hemmende Wirkung von EDTA auf Metalloproteasen (Zhang und Jones 1995, Fontanini und Jones 2001) und die Probenaufbereitung bei 8°C konnte auch hier keine störende Proteaseaktivität festgestellt werden.

#### **4.1.2 Vergleich der Probeentnahmetechniken mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese**

Um die Qualität der vergleichenden Analyse der Proteine aus den unterschiedlichen Sammeltechniken zu erhöhen, sollte für die Stylektomie- und EDTA-Probe eine zweidimensionale Proteintrennung etabliert werden. Dazu musste die stark verdünnte Proteinlösung aus der EDTA-Methode auf ein geeignetes Volumen eingeeengt werden. Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche IEF ist jedoch ein geringer Salzgehalt (Strahler et al. 1988), weshalb das Exsudationsmedium nicht durch eine Verdampfung (z.B. Vakuumkonzentration) reduziert werden konnte. Mit Hilfe von Durchflussskonzentratoren ergab sich die Möglichkeit, die Salzkonzentration zu verringern und andere niedermolekulare Verunreinigungen vor der IEF aus der Probe zu entfernen. Dabei stellte sich die Proteinbindekapazität einiger Membranfilter in Verbindung mit den sehr geringen Proteinmengen als problematisch heraus. Schließlich wurde mit den verwendeten Filtereinheiten und einer Vorbehandlung der Filtermembran eine Optimierung der gewonnenen Probenmenge erreicht. Außerdem wurde mit Hilfe der Chloroform/Methanol-Fällung (Wessel und Flügge 1984) eine Verbesserung der Löslichkeit des Proteinpellets aus der EDTA-Probe im IEF-Puffer erzielt. Eine Verbesserung in der zweidimensionalen Auftrennung der Proteine konnte mit der Verwendung des R2D2-IEF-Puffers nach Méchin et al. erreicht werden (Abb. 3.4). Durch die Kombination von zwei reduzierenden Substanzen (DTT und TECEP) und die Verwendung von zwei verschiedenen Detergenzien (CHAPS und SB3-10) konnte die Fokussierung im pH-Bereich von pH6-pH7 verbessert werden (Méchin et al. 2003). Damit konnten auch für die vergleichende Proteinanalyse wichtige Referenzspots im mittleren pH-Bereich der IPG-Gele getrennt werden (Abb. 3.5, 3.18). Anhand dieser Referenzspots konnte

die Phloemspezifität von EDTA-Proben (Kontrolle/behandelte Pflanzen) beurteilt werden, die Voraussetzung für einen Vergleich der Proteinmuster war.

In der Auftrennung der EDTA-Proben konnte zwischen den verschiedenen Versuchsansätzen, bei identischer Verarbeitung und Aufzucht der Pflanzen, ein stark unterschiedliches Proteinmuster festgestellt werden (Abb. 3.5). Trotzdem konnte nach der Identifizierung der potentiell phloemspezifischen Proteine im EDTA-Gel (Abb. 3.7) eine nahezu identische Abgabe von Phloemproteinen festgestellt werden. Zusammenfassend kann die Aussage getroffen werden, dass alle zur Referenzprobe (Stylektomieprobe) deckungsgleichen Spots der EDTA-Probe stets an identischen Stellen im Gel lokalisiert waren. Die zur Referenzprobe nicht-deckungsgleichen Spots aus der EDTA-Methode zeigten von Experiment zu Experiment, trotz einer identischen Versuchsdurchführung, stets unterschiedliche Auftrennungsmuster. Vermutlich handelt es sich hierbei um unspezifische Proteinartefakte aus den Membranen der angeschnittenen Zellen, die im Verlauf der sechsständigen Exsudation abgegeben werden. Möglicherweise ist hier auch ein Grund dafür zu sehen, dass die Analyse von Carbohydraten mittels der erleichterten Exsudation etablierter ist und häufiger angewendet wird. Artifiziale Zuckeranteile werden vermutlich effektiver, während der ersten Stunde der Exsudation, aus den angeschnittenen Zellen entfernt, sodass im weiteren Verlauf der Exsudation mit einer relativ phloemspezifischen Probe zu rechnen ist. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits von van Bel und Hess (2008) ermittelt.

Normalerweise ist eine Proteinmengenbestimmung vor der Beladung der IPG-Gele für den korrekten Vergleich von zweidimensionalen Proteingelen unverzichtbar. Aus den Proteintrennungen der EDTA-Proben wurde jedoch deutlich, dass eine Proteinmengenbestimmung keine Aussage über den Anteil der Phloemproteine in EDTA-Proben liefert. Eine möglichst gleiche Phloemspezifität von EDTA-Proben zwischen der Kontrolle und den Proben aus behandelten Pflanzen konnte deshalb nur mit einer einheitlichen Probenentnahme und Probenaufbereitung erzielt werden. Im Gegensatz zur EDTA-Methode konnte der Siebröhrensaft aus den Stylektomieproben bis zu einer Menge von 15µl ohne weitere Behandlung in den IEF-Probenpuffer aufgenommen werden. Insbesondere die hohe Kalium- und Zuckerkonzentration in den Stylektomieproben dürfte für das schlechte Fokussierungsverhalten mit einer höheren Probenmenge während der IEF verantwortlich sein. In Phloemproben aus Gerste wurden Kaliumkonzentrationen von



50-110mM gemessen (Fromm und Eschrich 1989), im Siebröhrensaft von Weizen konnte eine Kaliumkonzentration von 299mM ermittelt werden (Hayashi und Chino 1986). Die letzteren Autoren ermittelten ebenfalls eine Saccharosekonzentration von 251mM in Stylektomieproben aus Weizen. Ähnlich hohe Saccharosekonzentrationen (150-240mM) konnten auch in den Stylektomieproben aus Gerste ermittelt werden (3.1.8). Von Winter et al. (1992) konnten bereits Saccharosekonzentrationen von ca. 1000mM in Stylektomieproben aus Gerste ermittelt werden. Hier erfolgte die Probenentnahme jedoch unter hoher Luftfeuchtigkeit und nicht unter Öl, um der Verdunstung von Wasser vorzubeugen.

Mit einer Stylektomieprobenmenge von ca. 12µl konnte eine mit der EDTA-Methode (64 Pflanzen, 21d) vergleichbare Menge von phloemspezifischen Proteinen gewonnen werden. Die große Anzahl von Pflanzen, die während der erleichterten Exsudation nötig war, ergibt sich prinzipbedingt durch die Unterbrechung des Druckgradienten zwischen den oberirdischen Pflanzenteilen (*source*) und der Wurzel (*sink*). Mit der Abtrennung der oberirdischen Pflanzenteile ist die Druckstromtheorie nach Münch (1930) nicht mehr erfüllt und es ist mit einer deutlichen Verlangsamung der Translokationsgeschwindigkeit im Phloem zu rechnen.

Die Gewinnung einer Stylektomieprobe von 12µl erforderte ca. 30 exsudierende Stilette, die über einen Zeitraum von 6h Siebröhrensaft abgeben. Dazu waren ca. 120 erfolgreich kauterisierte Blattläuse nötig, da nur jedes vierte erfolgreich kauterisierte Stilett eine Abgabe von Siebröhrensaft zeigte. Zusätzlich ist mit einer Aussortierung von verunreinigten Proben, z.B. durch Kontakt mit dem Abwehrsekret der Blattläuse, Kontakt mit dem Klebstoff oder Kontakt mit der Blattoberfläche, zu rechnen. Die ermittelte Exsudationsrate von durchschnittlich 66 nl/h (0,4µl/6h, Abb. 3.26) entspricht dem von Doering-Saad et al. ermittelten Wert in Gerste von 60-120nl/h (Doering-Saad et al. 2002).

Als zusätzliche Qualitätskontrolle wurden einige Stylektomieproben mit RUBISCO-spezifischen *Primern* untersucht (3.1.7). Dabei konnte aus den Stylektomieproben, der photosynthetisch inaktiven Siebelemente, kein RUBISCO spezifisches PCR-Produkt amplifiziert werden, was auf eine besondere Reinheit der gewonnen Proben hindeutet (Ruiz-Medrano et al. 1999, Giavalisco et al. 2006). Durch eine sorgfältige Probensammlung, ohne Kontakt der Probe zur Epidermis, Hämolymphe oder dem Abwehrsekret der Aphiden, konnten ebenfalls RNase freie Proben aus den Siebelementen gewonnen werden. Dies deutet ebenfalls auf die Reinheit einer

siebelelementspezifischen Probe hin (Sasaki et al. 1998, Doering-Saad et al. 2002) und es besteht die Möglichkeit den Siebröhrensaft als *Template* in einer PCR-Reaktion einzusetzen.

In der zweidimensionalen Auftrennung von Stylektomieproben lässt sich im Gegensatz zur EDTA-Methode ein sehr stabiles Proteinmuster feststellen. Mit einer Probenmenge von 12µl Siebröhrensaft können bis zu 60 verschiedene Proteinspots im Gel detektiert werden. Die Daten unterstützen damit die Ergebnisse von Gaupels et al. (2008), die mit 100µl Stylektomieprobe (persönliche Mitteilung Dr. Frank Gaupels) bis zu 250 Proteine im Siebröhrensaft der Gerste nachweisen konnten. Diese Probenmenge erfordert allerdings einen sehr hohen Zeitaufwand, der nicht für vergleichende Proteingele geeignet erscheint. Für die Untersuchung der Phloemproben nach verschiedenen Behandlungen und unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Behandlung der Pflanzen musste demzufolge ein Kompromiss zwischen eingesetzter Proteinmenge und einem vertretbaren Zeitaufwand gefunden werden. Dies ist auch als Hauptgrund für die bisherigen phloemspezifischen Untersuchungen aus Stylektomieproben zu sehen, die meist auf den grundlegenden Inhalt der Siebelemente ausgelegt sind.

Nachdem die Vorraussetzungen für eine zweidimensionale Proteintrennung optimiert wurden, sollte mit Hilfe einer optischen Überlagerung der zweidimensionalen Gele aus den Stylektomie- und EDTA-Probe die phloemspezifischen Proteine der EDTA-Probe identifiziert werden. In der Falschfarbendarstellung (Abb. 3.7) der beiden Proben kann für einen Großteil der Proteine aus der Stylektomieprobe eine exakte Übereinstimmung mit den Proteinen der EDTA-Probe festgestellt werden. Trotzdem konnten für einige stark exprimierte Proteine aus der Stylektomieprobe keine deckungsgleichen Proteinspots in der Auftrennung der EDTA-Probe gefunden werden (Abb. 3.7). Dabei kann es sich nicht um Speichelproteine der zur Probengewinnung eingesetzten Aphiden handeln. Die Proteinmenge der verwendeten Aphiden reicht nicht für eine Detektion im Proteingel aus (Will et al. 2007). Außerdem konnte mit Hilfe der massenspektrometrischen Analyse ein nicht deckungsgleiches Protein aus der Stylektomieprobe als pflanzenspezifisch identifiziert werden (3.2.2). Auch Verunreinigungen, z.B. durch Hämolymphe, lassen sich durch eine optische Kontrolle während der Probensammlung und ein stets konstantes Proteinmuster der Stylektomieprobe ausschließen. Möglicherweise handelt es sich bei den nicht deckungsgleichen Spots um Proteine, die durch die

eingesetzten Aphiden verstärkt exprimiert wurden. Auch für das Protein P23K-3/4 konnte eine Auswirkung von *R.padi* ermittelt werden (3.2.8). Im Gegensatz zu P23K-3/4 konnten jedoch in den EDTA-Proben aus *R.padi* befallenen Gerstenpflanzen keine Proteinspots an den Fokussierungspunkten der nicht deckungsgleichen Proteine identifiziert werden. Anhand von Untersuchungen mit der Aphidenart *Sitobion yakini* im Zusammenhang mit dem Fraßverhalten auf Gerste konnte gezeigt werden, dass diese Aphidenart die dünnwandigen Siebelemente in Gerste stark bevorzugt (Matsiliza und Botha 2002). Bei einem ähnlichen Fraßverhalten von *R.padi* besteht demnach auch die Möglichkeit, mit der EDTA-Methode Phloemproteine zu gewinnen, die nicht durch die Stylektomie-methode zugänglich sind.

#### **4.1.3 Vergleich der phloemspezifischen Sammeltechniken mittels Carbohydratanalyse**

Mit Hilfe von Zuckeranalysen aus den unterschiedlichen Sammeltechniken sollten weitere Rückschlüsse auf den Verunreinigungsgrad der EDTA-Methode gewonnen werden. Eine erhöhte Menge von Hexosen im Exsudationsmedium lässt sich als Grad der Verunreinigung interpretieren (Tully und Hanson 1979, Groussol et al. 1986). Als Referenzwert für die Phloemspezifität diene der Saccharosegehalt von 96%, der aus Stylektomieproben nach mindestens 8h Belichtungsdauer ermittelt wurde. Dagegen konnte in den EDTA-Proben nur ein Saccharosegehalt von durchschnittlich 67% ermittelt werden. Anhand von Bestimmungen der Zuckertypen in Gerste aus unterschiedlichen Zelltypen ist mit einer Freisetzung von Hexosen aus Epidermis-, Mesophyll- und parenchymatischen Bündelscheidezellen zu rechnen (Tully und Hanson 1979, Koroleva et al. 1998). Im Gesamtblattextrakt konnte ein Saccharoseanteil von durchschnittlich 23% ermittelt werden (Abb.3.8). Damit ist zu erwarten, dass die EDTA-Probe mit zusätzlichen, nicht-phloemspezifischen Saccharoseanteilen aus unterschiedlichen Gewebetypen angereichert ist. Der Anteil der Siebelemente am Saccharosegehalt aus den Blattextrakten kann in dieser Messung vernachlässigt werden. Im Allgemeinen ist mit einem Phloemanteil in Blättern von nur ~0,5% zu rechnen (Sjölund 1997). Zusammenfassend lässt sich der phloemspezifische Saccharoseanteil der EDTA-Probe auf einen Anteil von ca. 40-50% abschätzen.

Obwohl sich der hohe Hexosenanteil, durch die wahrscheinlich unterschiedliche Abgabe von Carbohydraten und Proteinen aus den angeschnittenen Zellen, nicht

direkt mit den Proteinartefakten der EDTA-Methode vergleichen lässt, unterstützen die Daten der Zuckeranalyse den hohen Verunreinigungsgrad mit nicht phloemspezifischen Proteinen in der EDTA-Probe. Mit steigender Probenmenge der Stylektomieprobe ist daher nicht mit einer vollständigen Deckungsgleichheit der Proteinspots aus EDTA- und Stylektomieproben zu rechnen. Bessere Übereinstimmungen zwischen den beiden Probeentnahmetechniken konnten durch Weibull et al. (1990) ermittelt werden. Die Vergleichende Analyse von EDTA- und Stylektomieproben aus Gerste beschränkte sich jedoch auf phloemspezifische Aminosäureprofile (Weibull et al. 1990). Durch die hohe Empfindlichkeit der Aminosäurenanalyse mittels HPLC, wird hier das Verhältnis zwischen Schnittfläche und benötigter Probenmenge sehr günstig beeinflusst, was zur besseren Übereinstimmung zwischen EDTA- und Stylektomieprobe führt. Ein direkter Hinweis für eine Verunreinigung aus angeschnittenen Zellen konnte außerdem mit dem charakteristischen Spot der großen RUBISCO-Untereinheit in den zweidimensionalen Auftrennungen der EDTA-Proben gefunden werden. Dieser konnte in keinem der angefertigten Proteingele aus Stylektomieproben identifiziert werden.

Anhand des Saccharoseanteils als Referenzwert für eine erfolgreiche Exsudation von Phloemproben sollte der zeitliche Verlauf der EDTA unterstützten Exsudation näher untersucht werden. Nach einer stündlichen Bestimmung der Saccharose im Exsudationsmedium während der Exsudationsphase konnte eine verminderte Abgabe von Saccharose nach 4h ermittelt werden. Außerdem lässt die hohe Standardabweichung der Saccharosewerte, nach der 2. Stunde der Exsudation, auf eine unterschiedliche Abgabe einer phloemspezifischen Probe der einzelnen Pflanzen schließen (Abb. 3.10). Die offensichtlich individuell verschiedene Abgabe von Phloemproben der einzelnen Pflanzen stellte eines der Hauptprobleme der erleichterten Exsudation mit EDTA dar. Auch bei gleichmäßiger Verarbeitung und einer hohen Durchschnittsmenge der Pflanzen während der Probengewinnung wurde oft eine unterschiedliche Phloemspezifität in den zweidimensionalen Gelen festgestellt. Dies erhöhte die Schwierigkeit bei vergleichenden Proteingelen (z.B. Kontrolle/*Bgh* inokuliert), deren Voraussetzung eine ähnlicher Anteil von Phloemproteinen war.

#### **4.1.4 Veränderung der Carbohydrazusammensetzung in Stylektomieproben nach einer Dunkelphase der Gerste**

Während keine signifikanten Auswirkungen der Belichtung der Versuchspflanzen auf die Proteinzusammensetzung von phloemspezifischen Proben festgestellt wurde, konnte nach einer Dunkelphase der Gerste ein Einfluss auf die Zusammensetzung der Zucker ermittelt werden. In allen Untersuchungen von Stylektomieproben aus Poaceae wurde bisher ausschließlich Saccharose als Transportzucker identifiziert (Fukumorita und Chino 1982, Hayashi und Chino 1985, Winter et al. 1992).

Diese Daten konnten nach einer Lichtphase von 8h bestätigt werden. Nach einer 8h Dunkelphase wurde ein stark erhöhter Anteil von Hexosen in Stylektomieproben ermittelt (Abb. 3.9). Trotz der ungewöhnlich hohen Anteile von Hexosen, insbesondere von Glucose in den Stylektomieproben, konnten einige Fehlerquellen ausgeschlossen werden. Einer Kontaminierung durch Honigtautropfen, in denen ebenfalls ein hoher Anteil von Hexosen bestimmt werden konnte (Daten nicht gezeigt), wurde durch eine optische Kontrolle während der Probensammlung entgegengewirkt. Ebenfalls ist aus der Literatur keine Invertaseaktivität im Speichel von *R.padi* bekannt, die eine mögliche Quelle für einen erhöhten Hexosenanteil in Stylektomieproben darstellen könnte.

Ein Hinweis für eine dunkelabhängige Verunreinigung durch Glucose in Stylektomieproben ergibt sich aus einer erhöhten (1,3;1,4)- $\beta$ -D-Glucan Endohydrolase (Isoenzym E1) und (1,3;1,4)- $\beta$ -D-Glucan Exohydrolase ( $\beta$ -D-Glucan Glucohydrolase) Aktivität, die nach einer Dunkelphase der Gerste ermittelt wurde (Roulin et al. 2002). Bereits nach 6h Dunkelphase wurde eine Erhöhung von Transkripten der (1,3;1,4)- $\beta$ -D-Glucan Endohydrolase (Isoenzym E1) nachgewiesen. Hierbei konnte auch ein Abbau der  $\beta$ -D-Glucan Anteile in der Zellwand innerhalb von 24h nach einer Dunkelphase nachgewiesen werden. Die Autoren vermuten, dass die freigesetzte Glucose als universelle Energiequelle in der verdunkelten Pflanze dient. Eventuell lässt sich der erhöhte Glucoseanteil in Stylektomieproben auf ein methodisch bedingtes Leck von Glucose, aus dem Apoplasten der Siebelemente oder den angrenzenden Zellen zurückführen. An diesen Stellen sind bereits die Zellwände und die Plasmamembran durch das Aphidenstilet beschädigt. Anstelle einer experimentell bedingten Erhöhung von Hexosen besteht ebenfalls die Möglichkeit, dass Hexosen im geringen Umfang im Phloem der Gerste transportiert

werden. Auch Roulin et al. (2002) vermuten einen Translokation von Glucose in andere Pflanzenteile als Energielieferant in Dunkelphasen.

Auch in anderen Pflanzenfamilien gibt es erste Hinweise, dass ein Transport von Hexosen nicht auf die Familien der Ranunculaceae und Papaveraceae beschränkt ist, sondern auch im geringen Umfang in Pflanzenfamilien vorkommt, die bisher als Saccharosetransporter beschrieben wurden (van Bel und Hess 2008).

#### **4.2.1 Phloemspezifische Proteinanalyse nach Befall mit *Bgh***

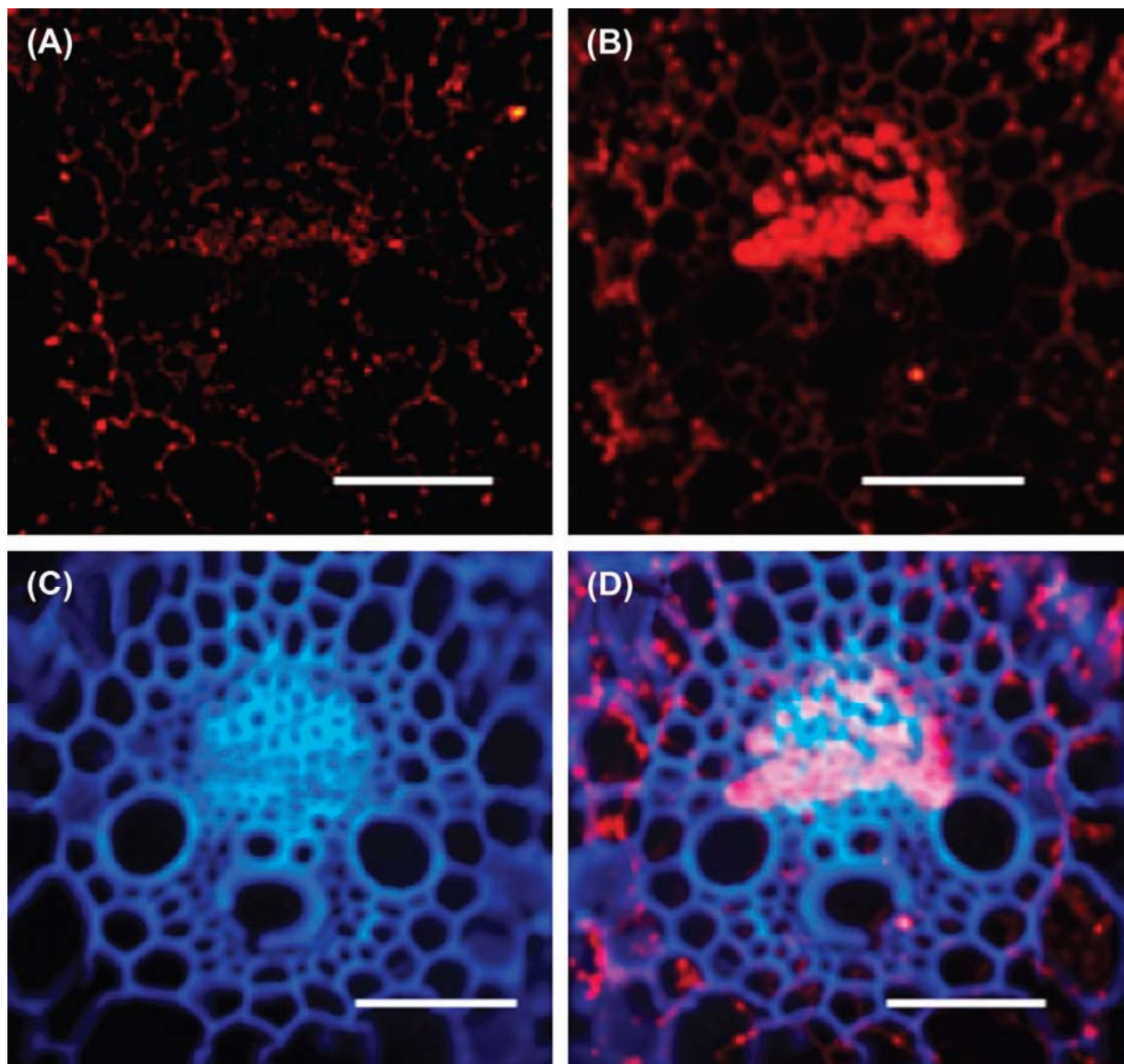
In der phloemspezifischen Proteinanalyse der Gerste konnte mit Hilfe der erleichterten Exsudation mit EDTA, die Hochregulierung eines Proteins im Siebröhrensaft nach *Bgh*-Befall gezeigt werden. Diese Reaktion konnte bereits 16-22hpi festgestellt werden (3.2.1). Das Ergebnis wurde außerdem nach einer ausschließlichen Inokulation der Blattspitzen reproduziert (3.2.4). Ebenfalls konnte eine systemische Hochregulierung des 23KDa Proteins nach Befall des 2. Blattes mit *R.padi* gezeigt werden (3.2.9). Mit Hilfe der massenspektrometrischen Analyse und Datenbanksuche konnte das Protein als P23K-3/4 aus *Hordeum vulgare* identifiziert werden (3.2.2). Die praktisch ermittelte Proteinmasse von 23kDa wurde mit Hilfe der Datenbankrecherche bestätigt.

Das Protein P23K wurde erstmals 2006 mit Hilfe von zweidimensionalen Proteingelen aus Gerstenkeimlingen (cv. Minorimugi) identifiziert (Kidou et al. 2006). Während der Keimungsphase ist das Protein wahrscheinlich am Zuckertransport zwischen Scutellum und Embryo beteiligt. In 14 Tagen alten Keimlingen konnte eine deutliche Abnahme der P23K Expression in den basalen Teilen der Gerste und im Scutellum des Keimlings im *Northern-Blot* festgestellt werden (Kidou et al. 2006). Im Laufe der Pflanzenentwicklung kommt es zu einer gesteigerten Expression von P23K in den Blättern. Insbesondere mit dem Leitbündel konnte das P23K-Protein assoziiert werden (Oikawa et al. 2007a).

Mit Hilfe von zweidimensionalen Proteintrennungen aus einem Gesamtblattextrakt und einer Überlagerung mit phloemspezifischen Proben (Abb. 3.23) konnte eine Kontaminierung der EDTA-Probe mit P23K-3/4 Anteilen aus nicht-phloemspezifischen Geweben weitgehend ausgeschlossen werden. Diese Ergebnisse unterstützen die Immunlokalisation (Oikawa et al. 2007a) von P23K (Abb. 4.1) im Phloemgewebe der Gerste. Durch Kidou et al. (2006) wurden 4 Isoformen von P23K (Abb. 3.15) identifiziert, deren unterschiedliche Funktion noch



nicht bekannt ist. Aufgrund der Expression von JIP-23 mRNAs und der ausbleibenden Expression von P23K mRNAs im Laufe der Samenentwicklung der Gerste wurde JIP-23 als paraloges Protein zu P23K bezeichnet (Oikawa et al. 2007b). Nach einem VIGS (*virus-induced gene silencing*) von P23K wurden morphologische Schäden im Sklerenchym der Mittelrippe und an den Blatträndern festgestellt. Gleichzeitig konnte P23K mRNA an diesen Stellen detektiert werden, wodurch eine Involvierung von P23K am Aufbau der sekundären Zellwand vermutet wurde (Oikawa et al. 2007a).



**Abb. 4.1** Lokalisierung von P23K und Polysacchariden im Leitbündel der Gerste. (A) Kontrolle, (B) P23K-Antikörper (rot), (C) Calcofluor-Weiß Kontrolle (blau), (D) Calcofluor-Weiß Co-Lokalisation mit P23K-Antikörper (pink), Maßstab 100µm, aus Oikawa et al. 2007

Diese Ergebnisse wurden später durch Oikawa et al. (2009) bestätigt. Nach einem VIGS von P23K konnte eine Reduktion in der Expression von *HvCsIF6* mRNAs

(*cellulose synthase-like genes*) festgestellt werden. Jedoch konnte keine Auswirkung auf die Expression von *HvCesA1* mRNAs (*cellulose synthase gene family*) oder *HvGSL* mRNAs (*callose synthase*) beobachtet werden (Oikawa et al. 2009). *CsIF*-Gene kodieren (1,3;1,4)- $\beta$ -D-Glucan Synthasen. Diese sind, ebenso wie Homologe zu P23K, hauptsächlich auf Gräser beschränkt und am Aufbau der sekundären Zellwandbildung in Gerste beteiligt (Burton et al. 2006, Oikawa et al. 2009). Nach einer Überexpression des *HvCsIF6*-Gens in Gerste wurde ein erhöhter Anteil der sekundären Zellwand in Epidermis-, Mesophyll-, und Faserzellen beobachtet. Insbesondere konnte ein erhöhter Anteil von (1,3;1,4)- $\beta$ -D-Glucanen im Leitbündel festgestellt werden (Burton et al. 2011).

In bisherigen Untersuchungen von Enzymen, die an der Zellwandverstärkung zur Pathogenabwehr von Mehltau beteiligt sind, wurde hauptsächlich eine wichtige Rolle für die Callose-Synthase (1,3- $\beta$ -Glucan Synthase) ermittelt. In *Arabidopsis* konnte der Callose-Synthase *GSL5* eine essentielle Funktion in der Papillenbildung nach Inokulation mit Mehltau zugeordnet werden (Jakobs et al. 2003). Auch in Gerste wurde als Hauptbestandteil der Papille die Callose (1,3- $\beta$ -Glucan) identifiziert (Stanbridge et al. 1971, Bayles et al. 1990), jedoch konnte nach Inokulation mit *Bgh* keine Erhöhung der Callose-Synthase Transkripte im Northern Blot nachgewiesen werden (Li et al. 2003).

Erkenntnisse über die Rolle von Cellulosesynthasen zur Pathogenabwehr konnten bisher hauptsächlich in dikotylen Pflanzen gewonnen werden. Schenk et al. (2000) berichten von einer gesteigerten Expression von Cellulosesynthase-Genen (*AtCesA*) und Cellulosesynthase-ähnlichen-Genen (*AtCsIB3*) nach Infektion von *Arabidopsis* mit dem Pilz *Alternaria brassicicola*. Außerdem konnte durch die Hemmung der Cellulosesynthase mit Isoxaben eine Akkumulation von Salicylsäure und Jasmonsäure sowie weitere Auswirkungen auf pathogeninduzierte Gene festgestellt werden (Hamann et al. 2009).

Im Pathosystem Gerste/echter Gerstenmehltau gibt es bisher noch keine Hinweise für eine Involvierung von Cellulosesynthasen bzw. von (1,3;1,4)- $\beta$ -D-Glucan Synthasen in der Pathogenabwehr, jedoch wurde eine Abgabe von Cellulasen aus den Konidiosporen von *Bgh* nachgewiesen. Dabei konnte zwischen 8hai bis 16hai eine verstärkte Abgabe von Cellulasen gezeigt werden (Suzuki et al. 1998). Besonders am Appressorium des zweiten Keimschlauches konnte eine Abgabe von Cellulasen lokalisiert werden (Pryce-Jones et al. 1999). Die von Suzuki et al. (1998)

ermittelten Zeiträume gehen der mit Hilfe der EDTA-Methode ermittelten Hochregulierung von P23K-3/4 voraus, die 16-22hai festgestellt wurde. Zu früheren Zeitpunkten konnte keine eindeutige Hochregulierung von P23K-3/4 nach Mehltaubefall ermittelt werden (3.2.1).

Anhand von Literaturhinweisen, bezüglich der Involvierung von P23K in den Zellwandaufbau von Monokotylen (4.2.1) und den ermittelten Zeiträumen der Hochregulierung von P23K-3/4, ergeben sich damit Hinweise, dass das Protein an der Zellwandverstärkung nach *Bgh*-Befall beteiligt ist. Hierbei konnte nicht ermittelt werden, ob P23K-3/4 an der Penetrationsstelle des Pilzes in Reparaturmechanismen der Zellwand nach *Bgh*-Befall involviert ist oder ob P23K-3/4 zur systemischen Verstärkung der Zellwand für die Abwehr von Sekundärbefall von *Bgh* beiträgt. In den Proteintaufentrennungen der Blattextrakte (Abb. 3.23, Kontrolle/+*Bgh*) konnte keine lokale Erhöhung von P23K-3/4 festgestellt werden, die möglicherweise auf eine Involvierung des Proteins in Reparatur- und Abwehrmechanismen an der Epidermis hindeuten. Der unter 3.2.5 beschriebene Versuch diente hauptsächlich dazu P23K-3/4-Anteile aus nicht-phloemspezifischen Geweben in EDTA-Proben auszuschließen. Eine Beteiligung von P23K-3/4 in der lokalen Zellwandverstärkung ist auch nach einer ausschließlichen Hochregulierung des Proteins in den Siebröhren denkbar. Beispielsweise könnte P23K-3/4 in Signalketten involviert sein, die im Phloem einen erhöhten Carbohydratbedarf zur Epidermis vermitteln.

Bezüglich einer unterschiedlichen starken Expression von P23K-3/4 in Pallas und Pallas *mlo5* nach *Bgh*-Befall konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abb. 3.22). Im Gegensatz dazu konnte in einer Untersuchung von PR-Gen-Transkripten nach *Bgh*-Befall eine früher einsetzende und verstärkte Expression von PR-Protein relevanten Transkripten in Pallas *mlo5* gezeigt werden (Peterhänsel et al. 1997), jedoch wurden diese Transkripte ebenso im Northern-Blot aus Pallas identifiziert. Möglicherweise können die geringen Unterschiede nicht mit der EDTA-Methode auf Proteinebene erfasst werden oder die Expression von P23K-3/4 liegt nicht im Signalweg von *mlo5*.

#### **4.2.2 Phloemspezifische Proteinanalyse nach Aphidenbefall (*R.padi*)**

Nachdem der deckungsgleiche 23kDa Spot aus der Stylektomieprobe ebenfalls als P23K-3/4 identifiziert werden konnte, sollten die Ergebnisse mit Hilfe der Stylektomiemethode reproduziert werden. Mit unterschiedlichen Versuchsansätzen,

bezüglich der Zeitpunkte der Probenentnahme und der Inokulation mit *Bgh*, konnten keine Hochregulierung von P23K-3/4 gegenüber der Kontrolle beobachtet werden. Im Gegensatz zur Probenentnahme mit Hilfe der erleichterten Exsudation mit EDTA, wurde P23K-3/4 als das quantitativ am stärksten exprimierte phloemspezifische Protein identifiziert (Abb. 3.25).

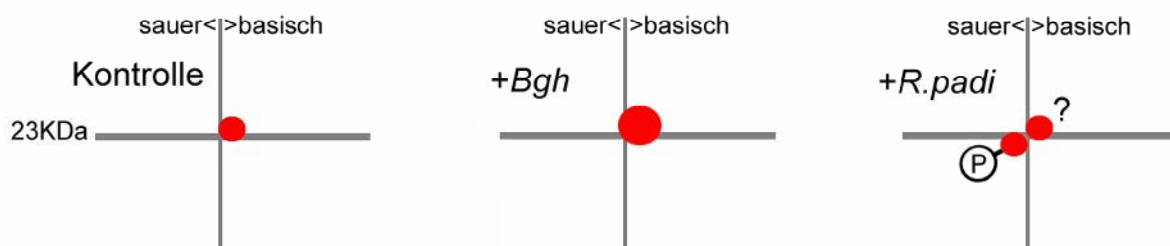
Durch die zuvor mit der EDTA-Methode ermittelte Pathogenrelevanz von P23K-3/4 ist auch eine Hochregulierung des Proteins durch die in der Stylektomie eingesetzten Aphiden nicht unwahrscheinlich. Im Pathosystem Gerste/*Bgh* ist die verstärkte Expression von PR-2a (1,3- $\beta$ -Glucanase) und PR-3a (Chitinase) Transkripten beschrieben (Gregersen et al. 1997). Auch im Pathosystem Gerste/*R.padi* wurde eine erhöhte Aktivität dieser Enzyme nach Befall ermittelt (Forslund et al. 2000). Trotz der unterschiedlichen Pathogene werden wahrscheinlich sehr ähnliche Komponenten der Signaltransduktion zur Pathogenabwehr ausgelöst. Beide Pathogene müssen die Epidermis der Pflanze zur Nährstoffaufnahme penetrieren. Ebenso ist eine Abgabe von Cellulasen sowohl für *Bgh* (Suzuki et al. 1998, Pryce-Jones et al. 1999), als auch für einige Aphidenarten beschrieben (Miles 1999). Auch aus den Speicheldrüsen von *R.padi* konnte neben einigen anderen zellwandabbauenden Enzymen (Pectinesterase, Polygalacturonase, Amylase) eine Cellulaseaktivität festgestellt werden (Ni et al. 2000). Dabei wird aktuell diskutiert, ob die Abgabe von Enzymen aus dem Speichelkanal den mechanischen Vortrieb der Mundwerkzeuge beschleunigen kann. Sehr wahrscheinlich ist, dass durch die Abgabe von Blattlausspeichel und die Abgabe von zellwandabbauenden Enzymen aus den Mehltausporen Elicitoren gebildet werden, die als Signalmoleküle zur Pathogenabwehr fungieren.

Ebenfalls ist die Entstehung eines Calcium-Signals nach Befall mit *Bgh* (Felle et al. 2004) und Aphiden (Will und van Bel 2006) beschrieben. Eine Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration kann durch die mechanische Verletzung des Apoplasten, durch die Mundwerkzeuge der Aphiden oder durch die Freisetzung von Oligogalacturoniden ausgelöst werden (Moscardiello et al. 2006). Zusammenfassend wird deutlich, dass sich die durch *Bgh*- und *R.padi*-Befall ausgelösten Signalkomponenten in vielen Punkten überschneiden und damit auch eine ähnliche Regulierung von P23K-3/4 durch beide Pathogene prinzipiell möglich erscheint.

Neben der Aktivierung der Callose-Synthase in Siebelementen zur Aphidenabwehr (Botha und Matsiliza 2004, Hao et al. 2008, Saheed et al. 2009) konnten ebenso

erste Hinweise auf eine Hochregulierung von phloemlokalisierten Cellulosesynthasegenen nach Blattlausbefall in Dikotylen festgestellt werden. Mit einer phloemspezifischen cDNA-Bibliothek aus Sellerie konnte 3 Tage nach Befall mit *Myzus persicae* eine systemische Hochregulierung von Cellulosesynthasegenen beschrieben werden (Divol et al. 2005).

Mit Hilfe der EDTA-Methode sollte die Auswirkung von *R.padi* auf eine Regulierung von P23K-3/4 untersucht werden. Im Gegensatz zur Stylektomiemethode ist hierbei eine phloemspezifische Probenentnahme ohne Aphidenreiz auf den Pflanzen der Kontrolle möglich. Aufgrund der Ergebnisse aus der Stylektomiemethode wurde ebenfalls mit einer Hochregulierung von P23K-3/4 gerechnet. Stattdessen konnte in der Auftrennung der EDTA-Probe aus *R.padi* befallenen Gerstenpflanzen ein zusätzlicher Spot in direkter Nähe zum *Bgh* induzierten P23K-3/4 festgestellt werden (Abb. 3.27, Abb. 3.29 b). In Relation zu P23K-3/4 fokussierte der *R.padi* induzierte Spot in Richtung des sauren pH-Bereiches. Außerdem konnte ein Molekulargewicht von etwa 22kDa ermittelt werden (Abb. 4.2).



**Abb. 4.2 Schematische Ergebnisübersicht der zweidimensionalen Proteintrennung aus EDTA-Proben nach Befall mit *Bgh* und *R.padi*. P23K-3/4 (rot), P=Phosphatrest**

Eine Verschiebung des P23K-3/4 Proteinspots aus der Stylektomieprobe in den sauren pH-Bereich konnte schon in der Überlagerung der beiden Probenentnahmetechniken (Abb. 3.7) beobachtet werden. Aufgrund der identischen massenspektrometrischen Identifizierung (Abb. 3.13) bezüglich P23K-3/4 aus Stylektomie- und EDTA-Proben konnte es sich bei dem neu ermittelten Proteinspot nach *R.padi* Befall ebenfalls um das Protein P23K-3/4 handeln. Zur Überprüfung wurde mit einer Probenmischung aus der Stylektomie- und EDTA-Methode nach gemeinsamer Auftrennung im Gel ein charakteristischer Doppelspot erzeugt (Abb. 3.28, Abb. 3.29 a). Dieser war mit EDTA-Proben aus *R.padi* befallenen Pflanzen identisch (Abb. 3.29). Obwohl eine massenspektrometrische Analyse des *R.padi* induzierten P23K-3/4 Proteinspots aufgrund der geringen Proteinmenge nicht



möglich war, konnte mit einer gemeinsamen Auftrennung der Phloemproben aus der Stylektomie- und EDTA-Methode gezeigt werden, dass P23K-3/4 ebenfalls durch *R.padi* Befall induziert wird. Eine deckungsgleiche Kontamination durch Proteinartefakte aus der EDTA-Probe kann weitgehend ausgeschlossen werden. Nach der Überprüfung von ca. 100 angefertigten zweidimensionalen Proteintrennungen aus EDTA-Proben ohne *R.padi*-Befall konnte kein deckungsgleicher Spot identifiziert werden.

Im Gegensatz zum *Bgh* induzierten P23K-3/4 Proteinspot zeigte der durch *R.padi* induzierte P23K-3/4 Proteinspot keine konstitutive Expression ohne Pathogenbefall. Dies ermöglichte eine Überprüfung des systemischen Transports bzw. einer systemischen Induzierung des Proteins in den 3. und 4. Blättern der Pflanze, nachdem ausschließlich das 2. Blatt mit *R.padi* befallen war und vor der erleichterten Exsudation mit EDTA vollständig entfernt wurde. Auch in diesen Experimenten konnte der typische P23K-3/4 Doppelspot in den Proteingelen festgestellt werden (Abb. 3.30). Dabei bleibt ungeklärt ob P23K-3/4 innerhalb von 42-48h nach Befall systemisch transportiert wird oder die Proteinexpression von P23K-3/4 im 3. und 4. Blatt systemisch induziert wird.

#### 4.2.3 Posttranslationale Modifikation von P23K-3/4

Ausgehend von einer identischen Aminosäuresequenz der Proteine P23K-3 und P23K-4 im Kultivar Pallas (Datenbankeintrag cv. Minorimugi) lassen sich die Laufunterschiede des *Bgh* und *R.padi* induzierten Proteinspots nicht mit der unterschiedlichen Aminosäuresequenz (Abb. 3.15) von P23K-3 und P23K-4 erklären. Für beide Proteine berechnet sich eine nahezu identische relative Molekülmasse von 22954.61 Da (P23K-3) und 22950.62 Da (P23K-4). Ebenfalls besitzen beide Proteine einen theoretisch ermittelten isoelektrischen Punkt von 6,5 (Bjellqvist et al. 1993, Bjellqvist et al. 1994, Gasteiger et al. 2005). Außerdem konnte im Spektrum des *Bgh* induzierten P23K-3/4 Proteinspots aus der EDTA-Methode die Massen für beide Proteine (P23K-3 und P23K-4) ermittelt werden (3.2.2).

Aufgrund des unterschiedlichen Laufverhaltens im Proteingel ist von einer posttranslationalen Modifikation bezüglich der Ladung und der relativen Molekülmasse auszugehen. Diese lässt sich im Fall der horizontalen Verschiebung in Richtung des sauren pH-Bereiches durch die Übertragung einer Phosphatgruppe durch Proteinkinasen erklären (Abb. 3.31). Diese sind generell in der Aktivierung von



Proteinen in verschiedensten Signalwegen involviert. Auch in der Pathogenabwehr gibt es Hinweise für eine Involvierung von CDPK (*calcium-dependent protein kinase*) (Freymark et al. 2007) und MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), die an vielfältigen Reaktionen in der Pathogenabwehr beteiligt sind (Zhang und Klessig 2001, Asai et al. 2002, Eckey et al. 2004).

Allerdings existieren keine Untersuchungen von phloemlokalisierten und calciumabhängigen Proteinkinasen, die nachweislich in der Abwehr von *Bgh* eine Rolle spielen. Zudem konnte bisher noch kein *Bgh* induziertes Calciumsignal im Phloem von Gerste gemessen werden. Trotzdem wurde bereits eine mRNA in Stylektomieproben aus Gerste identifiziert, die Homologien zu Genomsequenzen von Proteinkinasen aufweist (Gaupels et al. 2008). Auch im Siebröhrensaft von Reis wurden bereits CDPKs identifiziert (Nakamura et al. 1995). Generell besteht damit die Möglichkeit, dass die im Gel beobachtete horizontale Verschiebung des *R.padi* induzierten P23K-3/4 Spots auf die Bindung einer Phosphatgruppe zurückzuführen ist.

Der geringe Massenunterschied deutet auf eine unterschiedliche posttranslationale Modifikation von P23K-3/4 in Abhängigkeit der verschiedenen Pathogene (*R.padi*, *Bgh*) hin. Aus der Aminosäuresequenz von P23K-3/4 lassen sich mit Hilfe des Programms Prosite posttranslationale Modifikationen ableiten (Phosphorylierung und Glykosylierung), die Möglicherweise für den geringen Laufunterschied im Gel verantwortlich sind. In *Cucurbita* konnte bereits gezeigt werden, dass posttranslationale Modifikationen (Phosphorylierung und Glykosylierung) des Phloemproteins Cm-PP16-1 für Protein-Protein Interaktionen und für den Transport über PPUs essentiell sind (Taoka et al. 2007). Ein größerer Massenunterschied konnte außerdem durch Gaupels et al. (2008) für das Protein P23K-2 (Abb. 3.15) im eindimensionalen Proteingel ermittelt werden. Hier wurde P23K-2 jeweils aus einer 26kDa und einer 22kDa Proteinbande aus Stylektomieproben mittels Massenspektrometrie identifiziert. Eventuell existieren daher weitere Isoformen, für die noch kein Datenbankeintrag vorliegt. Auch für das Protein JIP-23 konnten mindestens 6 Isoformen identifiziert werden, die immunologisch durch einen einzigen Antikörper detektiert werden können, aber im Proteingel unterschiedliche isoelektrische Punkte und geringe Massenunterschiede aufweisen (Hause et al. 1996). Auch hierbei konnte nicht geklärt werden, ob die Isoformen auf verschiedene Genprodukte oder auf posttranskriptionale bzw. posttranslationale Modifikationen

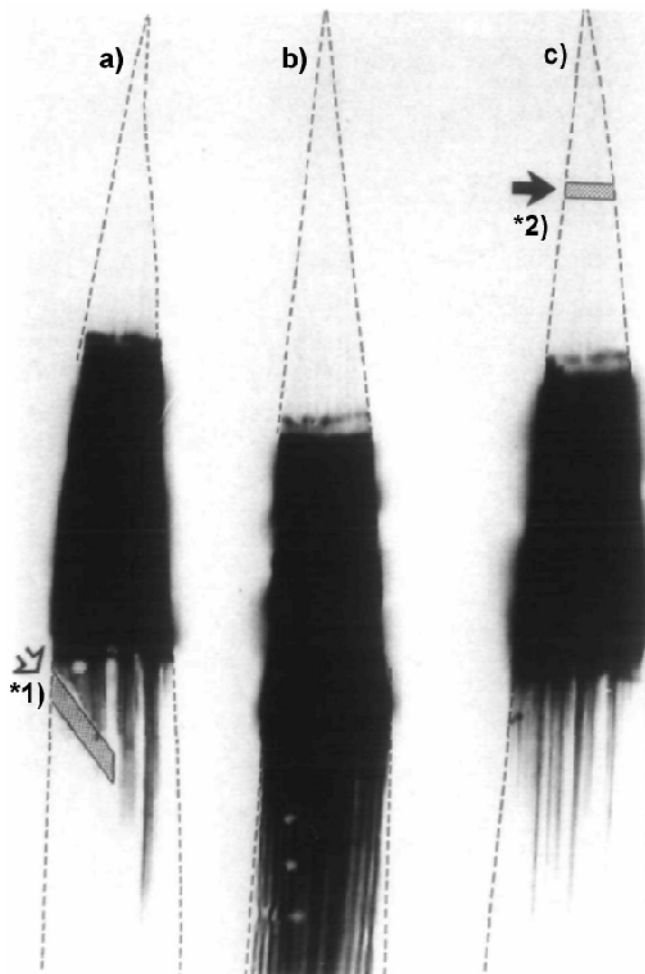
zurückzuführen sind. Kidou et al. (2006) vermuten, dass es sich bei einigen der Isoformen von JIP-23 um das Protein P23K handeln könnte. Interessanterweise konnte das Protein JIP-23 mit einer 87% Übereinstimmung der Aminosäuresequenz zu P23K-3/4 (Abb. 3.16) ebenfalls im Siebelement/Geleitzellenkomplex lokalisiert werden (Hause et al. 1996). Nach einer Besiedlung der Wurzel mit dem Mycorrhizapilz *Glomus intraradices* wurde eine Akkumulation von JIP-23 in den besiedelten Cortexzellen sowie in den Geleitzellen des Zentralzylinders beobachtet. Die Autoren vermuten einen Zusammenhang mit der Carbohydratversorgung des Pilzes (Hause et al. 2002).

#### **4.2.4 Verschlussreaktionen in Siebröhren nach Mehltaubefall und Brennreiz**

Während der Probenentnahme mit Hilfe der Stylektomie konnte aus den mit Mehltau befallenen Pflanzen eine verminderte Exsudationsrate von durchschnittlich 37% ermittelt werden (Abb. 3.26). Ein Anbrennen der Blätter in 4-8cm Abstand zur Probenentnahmestelle führte dagegen zu einem sehr schnellen (<5min) Verschluss der exsudierenden Stilette. Beide Beobachtungen lassen auf eine Verschlussreaktion der Siebelemente schließen. Diese kann durch Calloseablagerungen auf den Siebplatten oder durch koagulierende Phloemproteine vermittelt werden (Furch et al. 2007, Saheed et al. 2007, Saheed et al. 2009, Furch et al. 2010). Dabei bleibt unklar, ob der Nahrungs- und Speichelkanal der Mundwerkzeuge in ähnlicher Weise wie die Siebplatten verstopfen oder ob die beobachtete Reaktion auf Callose- oder Proteinablagerungen auf den Siebplatten zurückzuführen ist, wodurch sich der Massenstrom in den Siebelementen verlangsamt. Durch die Entfernung der Blattlaus wird kein wässriger Speichel mehr in den Nahrungskanal abgegeben, um ein koagulieren der Phloemproteine zu verhindern (Tjallingii 2006). Dadurch kann der dünne (1-2µm) Nahrungs- und Speichelkanal der Mundwerkzeuge dauerhaft verstopft werden (Tjallingii und Hogen Esch 1993).

Die Verschlussreaktion durch Calloseablagerungen auf Siebplatten ist eine gut untersuchte Reaktion, die auch nach Aphidenbefall im Phloem der Gerste induziert wird (Botha und Matsiliza 2004, Saheed et al. 2009, Saheed und Botha 2010). Im Gegensatz dazu wird ein Verschluss der Siebelemente durch koagulierende Phloemproteine in Monokotylen noch diskutiert (Will et al. 2009). Eine Voraussetzung für die Verschlussreaktion durch Calloseablagerungen auf Siebplatten ist die Erhöhung der cytosolischen bzw. der miktoplasmatischen

Calciumkonzentration zur Aktivierung der Callose-Synthase (Kauss et al. 1983, Köhle et al. 1985). Auch bei der Verschlussreaktion durch koagulierende Phloemproteine in Dikotyledonen ist die Beteiligung von Calciumionen wahrscheinlich (Arsanto et al. 1986, Furch et al. 2009, Furch et al. 2010). In Gerste konnte bereits ein apoplastisches Calciumsignal (2hai) und eine Alkalisierung des Apoplasten an der Epidermis nach Befall mit *Bgh* nachgewiesen werden (Felle et al. 2004), jedoch existieren bislang noch keine siebelementspezifischen Calciummessungen nach Mehltaubefall. In Dikotyledonen (*Cucurbita*) gibt es Hinweise, dass der schnelle Verschluss von Siebplatten durch koagulierte Phloemproteine vermittelt wird, während die *de novo* Callosesynthese einen etwas längeren Zeitraum (ca. 15min) für einen effektiven Siebelementverschluss beansprucht (Furch et al. 2010). Der sehr schnelle (<5min) Verschluss der Blattlausstylette nach dem Anbrennen der Blattspitzen in 4-8cm Abstand zur Probenentnahmestelle könnte demnach ein Hinweis für die Existenz von phloemspezifischen Verschlussproteinen in Gerste sein.



**Abb. 4.3 Macroautoradiographie von  $^{14}\text{CO}_2$  markierten Maisblättern. a) verminderte Translokationsgeschwindigkeit nach elektrischem Reiz (\*1), b) Kontrolle, c) verminderte Translokationsgeschwindigkeit nach Kälteschock (\*2). Aus Fromm und Bauer 1994**

Unabhängig von Verschlussmechanismus lässt die verminderte Exsudationsrate der Blattlausstilette nach *Bgh*-Befall auf eine verminderte Translokationsgeschwindigkeit im Phloem schließen. Sehr ähnliche Reaktionen konnten bereits nach einem Kälteschock und einem elektrischen Reiz in Mais ermittelt werden. Die elektrische Ableitung erfolgte in diesem Experiment über ein exsudierendes Blattlausstilet (Fromm und Bauer 1994). Nach dem entsprechenden Reiz konnten die gemessenen Aktionspotentiale mit einer verminderten Translokationsgeschwindigkeit (Abb. 4.3) in Verbindung gebracht werden. Dabei konnte eine erhöhte Entladung von Zuckern am Reizort ausgeschlossen werden, wodurch die Effekte ebenfalls auf eine Verschlussreaktion oder auf eine Verminderung der apoplastischen Phloembeladung zurückzuführen sind. Im Fall des Kälteschocks konnte außerdem eine Verminderung der Translokationsgeschwindigkeit in 10-20cm Abstand zum Reizort bestimmt werden (Fromm und Bauer 1994). Auch in Gerste konnten bereits systemische Aktionspotentiale am 1. Blatt abgeleitet werden, nachdem die Wurzel oder das 2. Blatt einem Reiz durch erhöhte Salzkonzentration ausgesetzt waren. Dabei konnte eine Geschwindigkeit des Aktionspotentials von 20-30cm/min ermittelt werden (Felle und Zimmermann 2007). Die verminderte Exsudationsrate könnte demnach ein Hinweis für ein systemisch propagiertes Aktionspotential im Phloem der Gerste nach Mehltaubefall sein. Vereinzelt wurden bereits elektrische Signale in Pflanzen mit pathogenrelevanten Reaktionen in Verbindung gebracht. In Kartoffel wurde z.B. die Jasmonsäurebiosynthese mit einem elektrischen Signal assoziiert (Fisahn et al. 2004).

Der schnelle Verschluss der exsudierenden Stilette nach einem Brennreiz lässt sich vermutlich mit einem stärker ausgeprägten elektrischen Signal in Verbindung bringen. In *Vicia faba* konnte bereits gezeigt werden, dass ein Brennreiz Aktions- und Variationspotentiale erzeugt. Eine Überlagerung dieser Signale wird aktuell als *electropotential wave* bezeichnet (Hafke et al. 2009). Das Aktionspotential wird durch einen Calciuminflux und Chloridefflux (Depolarisation) mit nachfolgendem Kaliumefflux (Repolarisation) ausgelöst. Durch die lokale Depolarisation öffnen sich weitere spannungsabhängige Calciumkanäle, wodurch ein Aktionspotential in den Siebelementen weitergeleitet wird (Hafke et al. 2009, van Bel et al. 2011). Ein Variationspotential wird wahrscheinlich durch eine Druckwelle im Xylem ausgelöst (Brennreiz) wodurch zusätzlich mechanosensitive Calciumkanäle im Siebelement aktiviert werden (Hafke et al. 2009, van Bel et al. 2011).

Die durch *Bgh*-Befall verursachte Verminderung der Translokationsgeschwindigkeit ist wahrscheinlich nicht auf eine verminderte Phloembeladung mit Photoassimilaten zurückzuführen. Diese ist durch die ermittelten Zeiträume nach der Inokulation wahrscheinlich auszuschließen (Scholes et al. 1994). Ein Einfluss auf die Photosyntheserate und den Zuckergehalt konnte hier erst 3 Tage nach Inokulation mit *Bgh* beobachtet werden. Bezüglich einer Verschlussreaktion der Siebelemente konnte für P23K-3/4 kein direkter Zusammenhang ermittelt werden. Nach einem Brennreiz und der Probenentnahme mit EDTA wurde kein Einfluss auf eine verstärkte Expression von P23K-3/4 festgestellt. Dabei konnte an der basalen Probenentnahmestelle in 20-30cm Abstand zum Brennreiz keine Verminderung von phloemspezifischen Proteinen im Gel beobachtet werden (3.2.13).

#### **4.2.5 Auswirkung der Jasmonsäuremethylester Behandlung auf P23K-3/4**

Aufgrund der hohen Übereinstimmung der Aminosäuresequenz von P23-K3/4 zum Jasmonsäure induzierten Protein JIP-23 (Abb. 3.16) sollte eine Regulierung von P23K-3/4 nach Behandlung der Gerstenpflanzen mit Jasmonsäuremethylester überprüft werden. In der Proteintrennung aus EDTA-Proben konnte keine Wirkung auf die Expression von P23K-3/4 festgestellt werden. Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen von Kidou et al. (2006) die ebenfalls keine Wirkung auf die Expression von P23K-1 im Northern Blot aus 3 Tage alten Keimlingen feststellten. Auch nach einem Brennreiz konnte keine verstärkte Expression von P23K-3/4 beobachtet werden. In Dikotylen wurde dieser Reiz bereits mit einer Akkumulation von Jasmonsäure assoziiert (Herde et al. 1996).

Generell wird die Rolle von Jasmonsäure bzw. von Jasmonsäuremethylester in der Pathogenabwehr, besonders in Monokotyledonen, kontrovers diskutiert. Kogel et al. (1995) konnten keine Wirkung einer Jasmonsäurebehandlung auf die Resistenz der Gerste gegen *Bgh* feststellen. Ebenso konnte kein Anstieg der endogenen Jasmonsäurekonzentration nach *Bgh*-Befall ermittelt werden (Hause et al. 1997). Dagegen gibt es auch Berichte über eine Induzierung der PAL-Aktivität (Phenylalanin-Ammoniak-Lyase) und eine systemisch induzierte Erhöhung der Resistenz gegen *Bgh* nach exogener Jasmonsäurebehandlung (Walters et al. 2002). Aufgrund der Phloemspezifität von P23K-3/4, im Zusammenhang mit einer exogenen Behandlung von intakten Pflanzen, ist jedoch eine generelle Involvierung des Proteins in einem Jasmonsäure abhängigen Signalweg nicht ausgeschlossen. In

Gerste sind zwei Gruppen verschiedener Gene bekannt, die unterschiedlich auf eine exogene Jasmonsäurebehandlung und auf einen endogenen Anstieg der Jasmonsäurekonzentration reagieren. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine exogene Jasmonsäurebehandlung nicht zu einem Anstieg der zellulären Jasmonsäurekonzentration führt (Kramell et al. 2000). Aufgrund der Phloemspezifität von P23K-3/4, der tief im Gewebe liegenden Siebelement- Geleitzellenkomplexe und der exogenen Applikation von intakten Blättern mit Jasmonsäuremethylester, ist eine Wirkung auf die Expression von P23K-3/4 schwer einzuschätzen.

#### **4.2.6 Verminderte Expression von P23K-3/4 nach Behandlung der Gerste mit DCINA**

Nachdem eine pathogenrelevante Wirkung auf die Expression von P23K-3/4 im Phloem der Gerste festgestellt wurde, sollte mit Hilfe von DCINA (Dichlorisonikotinsäure), einem Salicylsäureanalog, eine Wirkung auf die Regulierung von P23K-3/4 untersucht werden. Die Wirkung von DCINA als chemischer Resistenzinduktor für eine SAR (systemisch aktivierte Resistenz, *systemic acquired resistance*) wurde zuerst in Dikotyledonen beschrieben (Ward et al. 1991, Uknes et al. 1992). Auch im Pathosystem Gerste/echter Gerstenmehltau konnte eine Behandlung mit DCINA eine erhöhte Resistenz auslösen. Die chemisch induzierte Resistenz durch DCINA entspricht phänotypisch der durch *Mlg* vermittelten Resistenz gegenüber *Bgh* (Kogel et al. 1994). Nach einer Behandlung der Pflanzen mit DCINA konnte eine deutlich reduzierte Menge von P23K-3/4 gegenüber der Kontrolle festgestellt werden (Abb. 3.32-3.35).

Obwohl keine Auswirkung auf P23K-3/4 nach Behandlung mit Jasmonsäuremethylester festgestellt wurde, könnte damit ein Hinweis für eine Involvierung in einen jasmonsäureabhängigen Signalweg vorliegen. In Dikotyledonen ist eine Inhibierung von jasmonsäureabhängigen Signalwegen durch Salicylsäureanaloge eine oft untersuchte Reaktion (Doherty et al. 1988, Niki et al. 1998, Cipollini et al. 2004). Ebenso konnte ein Anstieg der endogenen Jasmonsäurekonzentration durch Behandlung der Pflanzen mit Salicylsäure unterdrückt werden (Peña-Cortés et al. 1993). Dabei wird NPR1 (*nonexpressor of PR genes*) eine zentrale Rolle zwischen der SA- und JA-Signalierung zugeschrieben (van Wees et al. 1999, van Wees et al. 2000, Spoel et al. 2003). Auch in Monokotyledonen existieren homologe Proteine zu NPR1 (OsNH1, HvNH1), und es



wird derzeit von einer sehr ähnlichen Funktion ausgegangen (Kogel und Langen 2005). Somit könnte eine Behandlung mit DCINA auch eine verminderte Expression von P23K-3/4 bewirken, falls die Expression von P23K-3/4 in jasmonsäureabhängigen Signalwegen liegt.

#### **4.2.7 Bestimmung der Peroxidaseaktivität im Siebröhrensaft von Gerste nach Befall mit *R.padi* und *Bgh***

Eine erhöhte Peroxidaseaktivität in Monokotylen ist nach Mehltaubefall (Thordal-Christensen et al. 1992, Kogel et al. 1994, Scott-Craig et al. 1995) und Blattlausbefall (van der Westhuizen et al. 1998, Argandoña et al. 2001) eine oft untersuchte Reaktion, die jedoch nicht auf phloemspezifischen Untersuchungen beruht. Mit Hilfe von Stylektomieproben bestand die Möglichkeit einer phloemspezifischen Aktivitätsmessung von Peroxidasen. Außerdem erwies sich die Methode als empfindlich genug, um mit den kleinen Probenmengen aus der Stylektomiemethode enzymatische Reaktionen zu messen. Peroxidasen sind generell in Polymerisationsreaktionen bei der Lignifizierung, Suberinisierung und Vernetzung der Zellwand unter Verbrauch von  $\text{H}_2\text{O}_2$  beteiligt (Passardi et al. 2004). In Hinblick auf  $\text{H}_2\text{O}_2$  als systemische Signalkomponente in pathogenrelevanten Signalwegen (Alvarez et al. 1998) und Peroxidasen als alternativen Quelle für die Produktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Bolwell et al. 2002), wurde die Peroxidaseaktivität im Siebröhrensaft des 3. Blattes bestimmt nachdem das 2. Blatt mit *Bgh* inokuliert wurde.

Während der Probenentnahme war es nicht möglich, im Zeitraum von 0-6h nach dem Abtrennen der Mundwerkzeuge eine Stylektomieprobe ohne erhöhte Peroxidaseaktivität zu gewinnen. (Abb. 3.38, 3.39, Probe 1). Erst im weiteren Verlauf verminderte sich die Peroxidaseaktivität der Kontrolle gegenüber den behandelten Pflanzen (Abb. 3.38-3.40). Möglicherweise wurde trotz der geringen Aphidenanzahl in den Sammelkäfigen eine lokale Erhöhung der Peroxidaseaktivität ausgelöst. Ähnliche Ergebnisse konnten mit einer Aktivitätsmessung von löslichen Peroxidasen aus einem Blattextrakt des Gerstenkultivars Frontera nach Befall mit *Schizaphis graminum* ermittelt werden. Nach Befall mit 20 Blattläusen wurde hier eine erhöhte Peroxidaseaktivität ermittelt. Diese korrelierte zeitlich mit einer erhöhten Konzentration von  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Argandoña et al. 2001). Im Gegensatz dazu konnten Forslund et al. (2000) und Ni et al. (2001) keine Erhöhung der Peroxidaseaktivität nach Befall der Gerste mit *R.padi* feststellen. Allerdings wurde in diesen Experimenten die Peroxidaseaktivität erst 3 Tage nach Aphidenbefall bestimmt.

Außerdem sind kultivarabhängige Reaktionen bekannt, in denen *Diuraphis noxia* unterschiedliche Peroxidaseaktivitäten auslöst (Ni et al. 2001).

Eine lokale Erhöhung der Peroxidaseaktivität an der Probenentnahmestelle kann ebenso durch Peroxidasen verursacht werden, die mit dem wässrigen Aphidenspeichel in das Siebelement abgegeben werden. Auch in den Speicheldrüsen von *R.padi* konnte Peroxidaseaktivität nachgewiesen werden, jedoch konnte nicht geklärt werden, ob das Enzym mit dem wässrigen Speichel ins Siebelement abgegeben wird (Ni et al. 2000).

Die lokale Aktivitätserhöhung an der Probenentnahmestelle konnte auch systemisch nachvollzogen werden. Nach einem massiven Befall des 2. Blattes mit *R.padi* wurde eine anhaltende Peroxidaseaktivität im 3. Blatt bestimmt (Abb. 3.39 b, Probe Nr.2). Aufgrund der meist schnell wachsenden Aphidenpopulation erscheint hier ein systemischer Effekt für die Verstärkung der Siebelementzellwände durch Peroxidasen sinnvoll. Diese erschwert ein Einstechen der Mundwerkzeuge und könnte damit zu einer erhöhten Resistenz gegen Aphidenbefall beitragen.

Nach dem Entfernen der Blattläuse und dem Aufteilen des Versuchsansatzes (Kontrolle, +*Bgh* 2. Blatt) konnte aus den Blattlausstiletten (3. Blatt) der inokulierten Pflanzen eine weiterhin erhöhte Peroxidaseaktivität festgestellt werden, während die Proben der Kontrolle stets eine Abnahme der Peroxidaseaktivität zeigten (Abb. 3.38 b, 3.39 b). Diese phloemspezifisch ermittelten Zeiträume korrelieren mit einem Anstieg der extrazellulären Peroxidaseaktivität, die 8-16h ai mit *Bgh* und unabhängig von den verwendeten Gerstenkultivaren (resistent und anfällig) festgestellt wurde (Kerby und Somerville 1989). Trotz der Beschränkung des Gerstenmehltaus auf die Epidermis wurde außerdem eine erhöhte Peroxidaseaktivität im gesamten Blatt nach *Bgh*-Befall beschrieben (Scott-Craig et al. 1995).

Neben einer Involvierung in Zellwandverstärkungen unter Verbrauch von  $H_2O_2$  werden Peroxidasen auch als alternative Quelle für die Produktion von  $H_2O_2$  beschrieben (Blee et al. 2001, Bolwell et al. 2002). Andere Autoren vermuten zunächst eine  $H_2O_2$  Synthese durch NADPH-Oxidasen und eine anschließend durch  $H_2O_2$  induzierte erhöhte Aktivität von Peroxidasen (Chaman et al. 2001, Moloi und van der Westhuizen 2006). Aufgrund der geringeren Reaktivität von  $H_2O_2$  im Gegensatz zu  $O_2^-$  wird  $H_2O_2$  auch als systemisch transportiertes Signal diskutiert (Alvarez et al. 1998, Orozco-Cárdenas et al. 2001). In *Arabidopsis* lassen sich durch lokale  $H_2O_2$  Produktion mit Hilfe von Glucoseoxidase Micro HRs (Hypersensitive

Reaktionen) in systemischen Blättern induzieren. Diese korrelieren lokal mit einer Anreicherung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Folge einer Behandlung mit *Pseudomonas syringae* bzw. einer künstlich erzeugten  $\text{H}_2\text{O}_2$  Produktion (Alvarez et al. 1998). Ebenfalls konnte eine systemisch erhöhte  $\text{H}_2\text{O}_2$  Konzentration in Tomate, durch die Behandlung mit Oligogalacturoniden und Chitosan nachgewiesen werden (Orozco-Cárdenas und Ryan 1999).

Mit einer Unterteilung der Probenentnahme in kleinere Zeitabschnitte (Abb. 3.40 a) wurde gezeigt, dass eine systemische Erhöhung der Peroxidaseaktivität in einem Zeitraum von <8h stattfindet (Abb. 3.40 b). Außerdem konnte in diesem Experiment durch eine zusätzliche Probenentnahme vor der Inokulation mit *Bgh* gezeigt werden, dass die Peroxidaseaktivität im Siebelement nach der Stylektomie zunächst abnimmt, sodass der folgende Anstieg der Aktivität wahrscheinlich auf die Inokulation mit *Bgh* zurückzuführen ist. Dieser Kontrollversuch wurde nur einmal reproduziert. Auch in *Arabidopsis* wurde eine systemisch erhöhte  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration in 1-2h nach Behandlung mit *Pseudomonas syringae* festgestellt (Alvarez et al. 1998). In Tomate wurde ein Zeitraum von 4-6h nach Verwundung ermittelt. Außerdem konnte hier eine verstärkte  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration mit dem Leitbündel assoziiert werden (Orozco-Cárdenas und Ryan 1999).

Mit der phloemspezifischen Bestimmung der Peroxidaseaktivität konnte gezeigt werden, dass  $\text{H}_2\text{O}_2$  wahrscheinlich an einer systemischen Signalvermittlung in Gerste beteiligt ist. Mit den Experimenten konnte allerdings nicht geklärt werden, ob  $\text{H}_2\text{O}_2$  systemisch transportiert und durch die erhöhte Peroxidaseaktivität im Zielgewebe entgiftet wird, oder ob Peroxidasen systemisch transportiert werden und im Zielgewebe  $\text{H}_2\text{O}_2$  produzieren.

#### **4.2.8 Systemisch induzierte Erhöhung von löslichen Phenolsäuren nach Befall mit *Bgh***

Phenolischen Komponenten wird in der lokalen Abwehr von *Bgh* eine wichtige Rolle zugeschrieben. Insbesondere konnte die Verstärkung der Zellwand bzw. die Papillenbildung mit einer Akkumulation von Phenolen assoziiert werden (von Röpenack et al. 1998, Hückelhoven et al. 1999, Prats et al. 2005). Vereinzelt werden auch systemische Effekte bezüglich einer Erhöhung der PAL-Aktivität, ein Schlüsselenzym zur Synthese von phenolischen Komponenten, beschrieben (Walters et al. 2002, Cowley und Walters 2005).

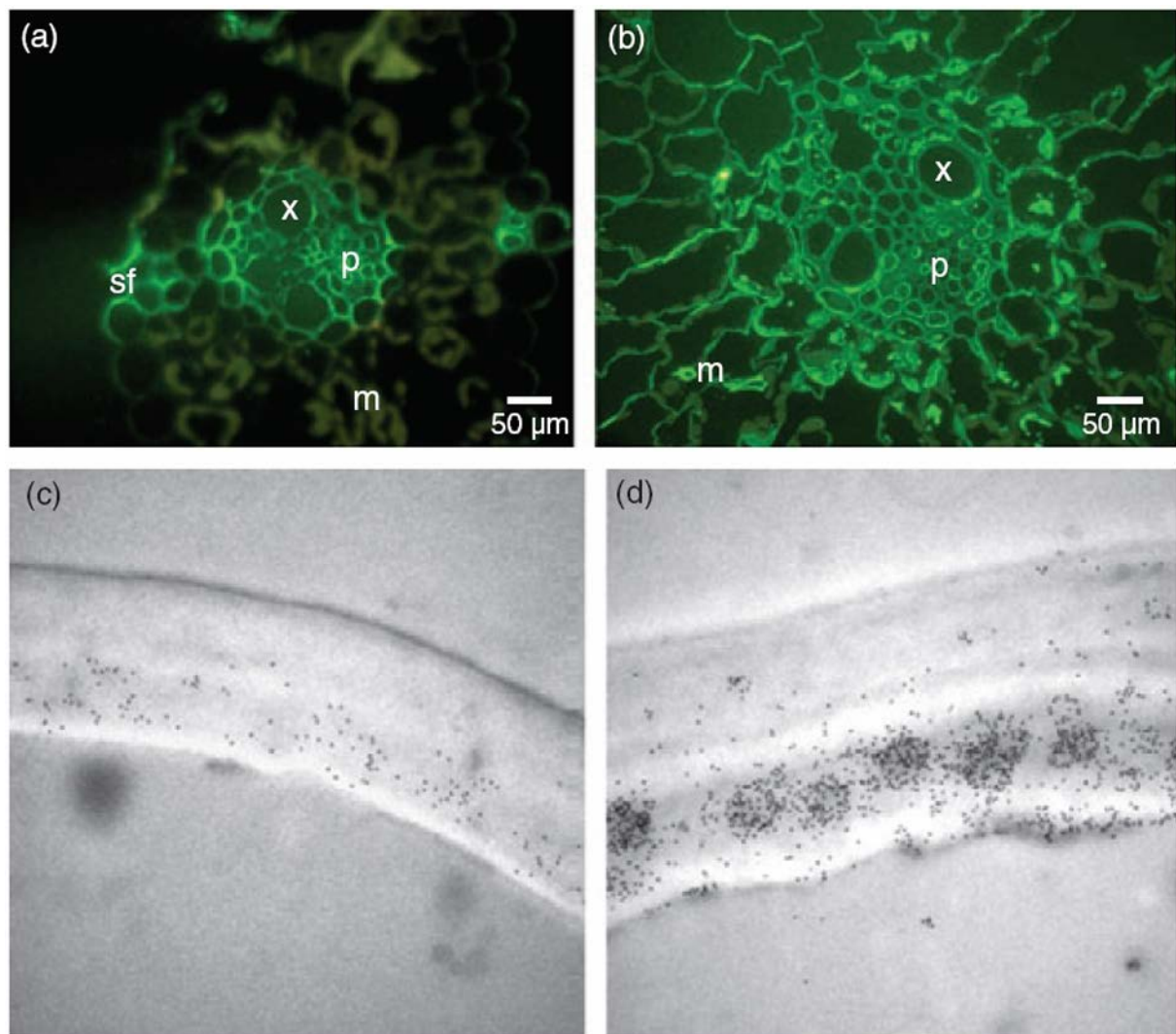
Eine Erhöhung von zwei verschiedenen Phenolsäuren konnte nach einer Inokulation des 2. Blattes im 4. Blatt bestimmt werden (Abb. 3.41). Aufgrund der ausbleibenden Papillenbildung des nicht inokulierten 4. Blattes könnte eine erhöhte Phenolsäurenkonzentration auf eine Verstärkung der gesamten Zellwand oder auf eine systemisch etablierte fungizide Wirkung hindeuten. Eine fungizide Aktivität von Phenolen konnte bereits *in vitro* ermittelt werden (von Röpenack et al. 1998). Besonders auffällig ist die dreifach erhöhte Konzentration der Phenolsäure mit einer Retentionszeit von 15min im 3. Blatt (Kontrolle und *Bgh* inokuliert) gegenüber dem 2. Blatt (Kontrolle und *Bgh* inokuliert) sowie weitere Abweichungen von Phenolsäurekonzentrationen der optisch identisch entwickelten Blätter. Damit besteht auch die Möglichkeit, dass die ermittelten Unterschiede im 4. Blatt gegenüber der Kontrolle auf geringe Unterschiede in der Blattentwicklung und nicht auf die Inokulation mit *Bgh* zurückzuführen sind. Das Experiment diene hauptsächlich zur Evaluierung von Probenmengen für weitere Analysen und wurde zunächst nicht weiter reproduziert. Außerdem konnten die unbekannten Phenolsäuren aufgrund von fehlenden Standardsubstanzen nicht identifiziert werden.

#### 4.2.9 Bestimmung der Zellwandmasse nach Befall mit *Bgh*

Wegen der Reduktion von *HvCsIF6* mRNAs ((1,3;1,4)- $\beta$ -D-Glucan Synthase) und den phänotypischen Schäden der sekundären Zellwandbildung nach einem VIGS von P23K (Oikawa et al. 2009) sollten Hinweise auf eine Verstärkung der sekundären Zellwand nach *Bgh*-Befall gewonnen werden. Durch den hohen Anteil der Zellwand am Trockengewicht der Pflanzen erfolgte eine Bestimmung des prozentualen Zellwandanteils (Trockenmasse) an der Frischmasse der Pflanzen.

Als Hauptbestandteile der Zellwand in Gerstenblättern wurden neben der Cellulose mit 63% und Heteroxylan mit 11% ein Anteil von 16% der (1,3;1,4)- $\beta$ -D-Glucane ermittelt (Fincher 2009). Ausgehend von einer systemischen Verteilung von P23K-3/4 nach Mehltaubefall und einer Wirkung auf die (1,3;1,4)- $\beta$ -D-Glucan Synthase wurde ein messbarer Effekt auf die Trockenmasse der Blätter nach *Bgh*-Befall erwartet. Nach einer Inokulation des 2. Blattes mit *Bgh* konnte aus den 3. und 4. Blättern im Kultivar Pallas *mlo5* eine Erhöhung der Trockenmasse von ca. 11% (48hai/*Bgh*) gegenüber den nicht inokulierten Pflanzen ermittelt werden (Abb. 3.43). Tendenziell konnten die Ergebnisse auch im 2. und 3. Blatt in Pallas sowie im 2. Blatt in Pallas *mlo5* reproduziert werden, jedoch waren diese Werte nicht statistisch abgesichert (Abb. 3.42). Mit Hilfe von transgenen Pro35S:*CsIF6* Gersten (Abb. 4.4)

konnte eine Erhöhung der (1,3;1,4)- $\beta$ -D-Glucan Anteile auf bis zu 6,4% (w/w) gegenüber den Kontrollpflanzen gezeigt werden (Burton et al. 2011).



**Abb. 4.4 (1,3;1,4)- $\beta$ -D-Glucan Anteile in Gerste (cv. Golden Promise) in Kontrollpflanzen (a,c) und transgenen Pro35S:CsIF6 Pflanzen (b,d).**

**a,b) Fluoreszenzmikroskopie der (1,3;1,4)- $\beta$ -D-Glucan Anteile (grün), p=Phloem, x=Xylem, m=Mesophylzellen, sf=Sklerenchymfasern a) Kontrolle b) erhöhte Anteile von (1,3;1,4)- $\beta$ -D-Glucanen in Pro35S:CsIF6 Pflanzen**

**c,d) Elektronenmikroskopische Aufnahme von Gold markierten (1,3;1,4)- $\beta$ -D-Glucan Antikörpern, Ausschnitt aus der epidermalen Zellwand, c) Kontrolle, d) erhöhte Anteile von (1,3;1,4)- $\beta$ -D-Glucanen in Pro35S:CsIF6 Pflanzen, aus Burton et al. 2011**

Obwohl diese Untersuchungen keine Pathogenrelevanz hatten spricht insbesondere die Verdickung der epidermalen Zellwand (Abb. 4.4 d, c) dafür, dass eine verstärkte Expression von (1,3;1,4)- $\beta$ -D-Glucan Synthasen eine erhöhte Resistenz gegen *Bgh* zuzufolge haben könnte.



#### 4.2.10 Fazit

Zusammenfassend wird deutlich, dass das Protein P23K-3/4 sehr wahrscheinlich durch *Bgh*- und *R.padi*-Befall verstärkt exprimiert wird und sich systemisch in der Gerste verteilt oder systemisch induziert wird. Anhand von Literaturhinweisen ist ebenfalls eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit der Zellwandverstärkung zu erwarten (4.2.1, 4.2.9). Obwohl P23K-3/4 vermutlich nicht nach Befall mit *Bgh* aus dem Siebröhren-Geleitzellenkomplex in andere Gewebe transportiert wird, könnte das Protein in Signalketten zur Carbohydratversorgung von zellwandaufbauenden Enzymen involviert sein (4.2.1).

Die Induzierung von Phenolen (4.2.8) gibt ebenfalls Hinweise auf eine systemisch induzierte Verstärkung von Zellwänden nach *Bgh*-Befall. Ebenso ist eine fungizide Wirkung von Phenolen in der Literatur beschrieben. Auch Peroxidasen sind nach Pathogenbefall in Zellwandverstärkungen involviert. Durch die phloemspezifische Bestimmung der Peroxidaseaktivität (4.2.7) ergeben sich aber vielmehr Hinweise auf eine Beteiligung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für eine systemische Signalvermittlung.

Die Verschlussreaktionen in den Siebröhren (4.2.4) lassen auf ein Calciumsignal schließen, welches möglicherweise eine verstärkte Expression von P23K-3/4 in den Geleitzellen bewirkt. Anhand eines Calciumsignals in den Siebröhren sind ebenfalls posttranslationale Proteinmodifikationen von P23K-3/4 durch calciumabhängige Proteinkinasen denkbar (4.2.3), die möglicherweise die unterschiedliche Lokalisation von P23K-3/4 im Gel erklären.



## 5 Zusammenfassung

Mit Hilfe der erleichterten Exsudation mit EDTA und der Probenentnahme mittels Stylektomie wurden phloemspezifische Proben aus Gerste gewonnen. Mit einer Untersuchung der Siebröhrenproteine nach Befall mit *Blumeria graminis* (*Bgh*) sollten Rückschlüsse auf (Protein)-Signale gewonnen werden, die eine systemisch erhöhte Resistenz nach *Bgh*-Befall vermitteln. Dazu wurde für beide Probenentnahmetechniken eine zweidimensionale Proteintrennung etabliert. Zusätzlich wurde das prinzipbedingte Verunreinigungspotential der EDTA-Methode verifiziert (Gaupels F, Knauer T und van Bel AJE, Journal of Plant Physiology 2008, 165: 95-103).

Nach einer Inokulation der Blattspitzen konnte ein erhöhter Anteil (16-22hai) von P23K-3 bzw. dem nahezu identischen Protein P23K-4 (P23K-3/4) in EDTA-Proben ermittelt werden. Mit Hilfe der Stylektomiemethode konnte keine Hochregulierung von P23K-3/4 nach *Bgh*-Befall festgestellt werden, jedoch wurde gezeigt, dass die in der Stylektomie eingesetzten Aphiden ebenfalls zu einer Hochregulierung von P23K-3/4 führen. Die im Gel ermittelten unterschiedlichen Fokussierungspunkte von P23K-3/4 nach *R.padi*- und *Bgh*-Befall lassen sich nicht auf die unterschiedliche Aminosäuresequenz der Proteine, sondern wahrscheinlich auf eine unterschiedliche posttranslationale Modifikation zurückführen. Nach einem *R.padi*-Befall des 2. Blattes und der Entfernung des 2. Blattes vor der Probenentnahme konnte aus den verbleibenden Blättern ebenfalls eine erhöhte Menge von P23K-3/4 in EDTA-Exsudaten festgestellt werden. Dabei konnte nicht ermittelt werden, ob das Protein in der Pflanze systemisch verteilt oder systemisch induziert wurde. Eine Behandlung der Gerste mit dem chemischen Resistenzinduktor DCINA führte, im Gegensatz zum Befall mit *Bgh*, zu einer verminderten Menge von P23K-3/4 in EDTA-Exsudaten. Eine Wirkung von Jasmonsäure auf die Expression des Proteins konnte nicht festgestellt werden. Anhand von Literaturhinweisen konnte für P23K-3/4 eine Rolle in der Zellwandverstärkung nach Befall mit *Bgh* ermittelt werden. In diesem Zusammenhang wurde eine um 11% erhöhte Zellwandmasse nach *Bgh*-Befall des 2. Blattes in den restlichen Blättern ermittelt. Die erhöhte Zellwandmasse deutet auf eine systemische Verstärkung der Zellwand hin, die möglicherweise zu einer erhöhten Resistenz gegen *Bgh* beiträgt. Neben dem Schwerpunkt der phloemspezifischen Proteinanalyse wurde außerdem eine verminderte Translokationsgeschwindigkeit in Siebröhren nach Inokulation mit *Bgh* ermittelt. Anhand von Literaturhinweisen lässt sich diese mit elektrischen Signalen im Phloem der Gerste in Verbindung bringen. Ein Calciumsignal im Siebelement könnte damit der Ausgangspunkt für vielfältige Reaktionen bezüglich einer Proteinexpression, der Aktivierung von Proteinkinasen und weiterer Abwehrkomponenten sein. Außerdem konnte eine systemisch erhöhte Peroxidaseaktivität nach Befall mit *Bgh* und *R.padi* bestimmt werden. Dies deutet auf eine Involvierung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in der systemischen Signalvermittlung nach Pathogenbefall hin.

## 5 Summary

Aphid stylectomy and EDTA-facilitated exudation were used to obtain sieve-tube sap samples to identify shifts in the (protein)-composition of barley phloem sap, which are indicative for systemic signalling after infection with *Blumeria graminis* (*Bgh*). For both sampling techniques a two-dimensional protein separation was established including an arsenal of purification steps for EDTA-probes. Potential contamination by artefactual proteins induced by the EDTA method was verified (Gaupels F, Knauer T and van Bel AJE, Journal of Plant Physiology 2008, 165: 95-103).

Increased levels of P23K-3 or the nearly identical protein P23K-4 (P23K-3/4) were found 16-22hai with *Bgh* in EDTA samples. No up-regulation of P23K-3/4 after *Bgh* infection was observed using aphid stylectomy. However, it was shown that aphid infestation (and in particular stylet insertion) lead to up-regulation of P23K-3/4. The different isoelectric points of P23K-3/4 obtained in sieve-tube samples after *R.padi* infestation and inoculation with *Bgh* could not be explained by the slightly different amino acid sequences of the proteins but are likely due to different post-translational modifications. After *R.padi* infestation of the second leaf and removal of the second leaf prior to sampling, the remaining leaves also showed increased amounts of P23K-3/4 in EDTA exudates. Treatment of barley leaves with the chemical resistance inductor DCINA led, in contrast to infestation with *Bgh*, to a reduced amount of P23K-3/4 in EDTA exudates. This indicates involvement of jasmonic acid in the expression/production of P23K-3/4, but direct effects of jasmonic acid on the P23K-3/4 levels could not be detected. According to literature sources, P23K-3/4 plays a pivotal role in secondary cell wall formation. In this context, the present work points to a systemically induced cell wall reinforcement which was confirmed by an 11% increase in dry weight of systemic leaves of infected plants.

After inoculation with *Bgh*, reduced exudation from sieve tubes was found which points to a reduced mass flow in phloem. Most likely, the decreased exudation rate was triggered by electrical long-distance signals propagated subsequent to inoculation. A accompanying  $\text{Ca}^{2+}$  influx may trigger a cascade of events in parenchymatous cells along the phloem pathway leading to, among others, an increased activity of peroxidases and the expression of P23K-3/4. It is unclear, if these substances were distributed or induced systemically. In any event, this conglomerate of reactions after *Bgh*-infection leads to higher deposition of phenolic substances and cellulose in systemic leaves and, hence, to a putative higher resistance.

## 6 Literaturverzeichnis

- Aki T, Shigyo M, Nakano R, Yoneyama T, Yanagisawa S (2008) Nano scale proteomics revealed the presence of regulatory proteins including three FT-like proteins in phloem and xylem saps from rice. *Plant Cell Physiology* 49: 767-790
- Alvarez ME, Pennell RI, Meijer PJ, Ishikawa A, Dixon RA, Lamb CJ (1998) Reactive oxygen intermediates a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* 92: 773-784
- Aoki K, Kragler F, Xoconostle-Cázares B, Lucas WJ (2002) A subclass of plant heat shock cognate 70 chaperones carries a motif that facilitates trafficking through plasmodesmata. *PNAS* 99: 16342-16347
- Argandoña VH, Chaman M, Cardemil L, Muñoz O, Zúñiga GE, Corcuera LJ (2001) Ethylene production and peroxidase activity in aphid-infested barley. *Journal of Chemical Ecology* 27: 53-68
- Arsanto JP (1986)  $\text{Ca}^{2+}$ -binding sites and phosphatase activities in sieve element reticulum and P-protein of chick-pea phloem. A cytochemical and x-ray microanalysis survey. *Protoplasma* 132: 160-171
- Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu WL, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J (2002) MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* 415: 977-983
- Badr A, Müller K, Schäfer-Pregl R, El Rabey H, Effgen S, Ibrahim HH, Pozzi C, Rohde W, Salamini F (2000) On the origin and domestication history of barley (*Hordeum vulgare*). *Molecular Biology and Evolution* 17: 499-510
- Balachandran S, Xiang Y, Schobert C, Thompson GA, Lukas WJ (1997) Phloem sap proteins from *Cucurbita maxima* and *Ricinus communis* have the capacity to traffic cell to cell through plasmodesmata. *PNAS* 94: 14150-14155
- Banerjee AK, Chatterjee M, Yu Y, Suh SG, Miller WA, Hannapel DJ (2006) Dynamics of a mobile rna of potato involved in a long-distance signaling pathway. *The Plant Cell* 18: 3443-3457
- Barnes A, Bale J, Constantinidou C, Ashton P, Jones A, Pritchard J (2004) Determining protein identity from sieve element sap in *Ricinus communis* L. by quadrupole time of flight (Q-TOF) mass spectrometry. *Journal of Experimental Botany* 55: 1473-1481
- Bayles CJ, Ghemawat MS, Aist JR (1990) Inhibition by 2-deoxy-D-glucose of callose formation, papilla deposition, and resistance to powdery mildew in an ml-o barley mutant. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 36: 63-72
- Berggren K, Chernokalskaya E, Steinberg TH, Kemper C, Lopez MF, Diwu Z, Haugland, RP, Patton WF (2000) Background-free, high sensitivity staining of proteins in one- and two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using a luminescent ruthenium complex. *Electrophoresis* 21: 2509-2521
- Berkelman T, Academia K, Liu N, Wehr T (2009) Comparison of SYPRO Ruby and Flamingo Fluorescent Gel Stains With Respect to Compatibility With Mass Spectrometry. *Bio-Rad Laboratories Technical Note* 5754
- Bjellqvist B, Hughes GJ, Pasquali C, Paquet N, Ravier F, Sanchez JC, Frutiger S, Hochstrasser DF (1993) The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis* 14: 1023-1031
- Bjellqvist B, Basse B, Olsen E, Celis JE (1994) Reference points for comparisons of two-dimensional maps of proteins from different human cell types defined in a pH scale where isoelectric points correlate with polypeptide compositions. *Electrophoresis* 15: 529-539

- Blee KA, Jupe SC, Richard G, Bolwell GP (2001) Molecular identification and expression of the peroxidase responsible for the oxidative burst in French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and related members of the gene family. *Plant Molecular Biology* 47: 607-620
- Bolwell GP, Bindschedler LV, Blee KA, Butt VS, Davies DR, Gardner SL, Gerrish C, Minibayeva F (2002) The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *Journal of Experimental Botany* 53: 1367-1376
- Both M, Csukai M, Stumpf MPH, Spanu PD (2005) Gene Expression Profiles of *Blumeria graminis* Indicate Dynamic Changes to Primary Metabolism during Development of an Obligate Biotrophic Pathogen. *The Plant Cell* 17: 2107-2122
- Botha CEJ und Cross RHM (1997) Plasmodesmatal frequency in relation to short-distance transport and phloem loading in leaves of harley (*Hordeum vulgare*). Phloem is not loaded directly from the symplast. *Physiologia Plantarum* 99: 355-362
- Botha CEJ und Matsiliza B (2004) Reduction in transport in wheat (*Triticum aestivum*) is caused by sustained phloem feeding by the Russian wheat aphid (*Diuraphis noxia*). *African Journal of Botany* 70: 249-254
- Brady J (1965) A simple technique for making very fine, durable dissecting needles by sharpening tungsten wire electrolytically. *Bull World Health Organ* 32: 143-144
- Buhtz A, Springer F, Chappell L, Baulcombe DC (2008) Identification and characterization of small RNAs from the phloem of *Brassica napus*. *The Plant Journal* 53: 739-749
- Burton RA, Wilson SM, Hrmova M, Harvey AJ, Shirley NJ, Medhurst A, Stone BA, Newbigin EJ, Bacic A, Fincher GB (2006) Over-expression of specific HvCslF cellulose synthase-like genes in transgenic barley increases the levels of cell wall (1,3;1,4)- $\beta$ -D-glucans and alters their fine structure. *Science* 311: 1940-1942
- Burton RA, Collins HM, Kibble NAJ, Smith JA, Shirley NJ, Jobling SA, Henderson M, Singh RR, Pettolino F, Wilson SM, Bird AR, Topping DL, Bacic A, Fincher GB (2011) Over-expression of specific HvCslF cellulose synthase-like genes in transgenic barley increases the levels of cell wall (1,3;1,4)- $\beta$ -D-glucans and alters their fine structure. *Plant Biotechnology Journal* 9: 117-135
- Carver TLW, Ingerson-Morris SM, Thomas BJ, Zeyen RJ (1995) Early interactions during powdery mildew infection. *Canadian Journal of Botany* 73: 632-639.
- Casaretto JA und Corcuera LJ (1998) Proteinase inhibitor accumulation in aphid-infested barley leaves. *Phytochemistry* 49: 2279-2286
- Chaman ME, Corcuera LJ, Zúñiga GE, Cardemil L, Argandoña VH (2001) Induction of soluble and cell wall peroxidases by aphid infestation in barley. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 2249-2253
- Chamnongpol S, Willekens H, Moeder W, Langebartels C, Sandermann H, Jr., Van Montagu M, Inze D, Van Camp W (1998) Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in transgenic tobacco. *PNAS* 95: 5818-5823
- Chester KS (1933) The problem of acquired physiological immunity in plants. *Quarterly Review of Biology* 8: 275-324
- Cho BH und Smedegård-Petersen V (1986) Induction of resistance to *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* in near-isogenic barley lines. *Phytopathology* 76: 301-305
- Christensen AB, Cho BH, Næsby M, Gregersen PL, Brandt J, Madriz-Ordeñana K, Collinge DB, Thordal-Christensen H (2002) The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins. *Molecular Plant Pathology* 3: 135-144

- Christensen AB, Thordal-Christensen H, Zimmermann G, Gjetting T, Lyngkjær MF, Dudler R, Schweizer P (2004) The germinlike protein GLP4 exhibits superoxide dismutase activity and is an important component of quantitative resistance in wheat and barley. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17: 109-117
- Cipollini D, Enright S, Traw MB, Bergelson J (2004) Salicylic acid inhibits jasmonic acid-induced resistance of *Arabidopsis thaliana* to *Spodoptera exigua*. *Molecular Ecology* 13: 1643-1653
- Coram TE, Huang X, Zhan G, Settles ML, Chen X. (2010) Meta-analysis of transcripts associated with race-specific resistance to stripe rust in wheat demonstrates common induction of blue copper-binding protein, heat-stress transcription factor, pathogen-induced WIR1A protein, and ent-kaurene synthase transcripts. *Functional and Integrative Genomics* 10: 383-392
- Corbesier L, Vincent C, Jang S, Fornara F, Fan Q, Searle I, Giakountis A, Farrona S, Gissot L, Turnbull C, Coupland G (2007) FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science* 316: 1030-1033
- Cowley T und Walters D (2005) Local and systemic effects of oxylipins on powdery mildew infection in barley. *Pest Management Science* 61: 572-576
- Dean RA und Kuć J (1986) Induced systemic protection in cucumbers: the source of the "signal". *Physiological and Molecular Plant Pathology* 28: 227-233
- Delp G, Gradin T, Ahman I, Jonsson LMV (2009) Microarray analysis of the interaction between the aphid *Rhopalosiphum padi* and host plants reveals both differences and similarities between susceptible and partially resistant barley lines. *Molecular Genetics and Genomics* 281: 233-248
- Derrick PM, Barker H, Oparka KJ (1990) Effect of virus infection on symplastic transport of fluorescent tracers in *Nicotiana clelandii* leaf epidermis. *Planta* 181: 555-559
- Divol F, Vilaine F, Thibivilliers S, Amselem J, Palauqui JC, Kusiak C, Dinant S (2005) Systemic response to aphid infestation by *Myzus persicae* in the phloem of *Apium graveolens*. *Plant Molecular Biology* 57: 517-540
- Doering-Saad C, Newbury HJ, Bale JS, Pritchard J. (2002) Use of aphid stylectomy and RT-PCR for the detection of transporter mRNAs in sieve elements. *Journal of Experimental Botany* 53: 631-637
- Doering-Saad C, Newbury HJ, Couldridge CE, Bale JS, Pritchard J (2006) A phloem-enriched cDNA library from *Ricinus*: insights into phloem function. *Journal of Experimental Botany* 57: 3183-3193
- Doherty HM, Selvendrant RR, Bowlest DJ (1988) The wound response of tomato plants can be inhibited by aspirin and related hydroxy-benzoic acids. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 33: 377-384
- Douchkov D, Johrde A, Nowara D, Himmelbach A, Lueck S, Niks R, Schweizer P, (2011) Convergent evidence for a role of WIR1 proteins during the interaction of barley with the powdery mildew fungus *Blumeria graminis*. *Journal of Plant Physiology* 168: 20-29
- Downing N, Unwin DM (1977) A new method for cutting the mouthparts of feeding aphids. *Physiological Entomology* 2: 275-277
- Dumas B, Freyssinet C, Pallett KE (1995) Tissue-specific expression of germin-like oxalate oxidase during development and fungal infection of barley seedlings. *Plant Physiology* 107: 1091-1096
- Ebrahim-Nesbat F, Behnke S, Kleinhofs A, Apel K (1989) Cultivar-related differences in the distribution of cell-wall-bound thionins in compatible and incompatible interactions between barley and powdery mildew. *Planta* 179: 203-210
- Ebrahim-Nesbat F, Bohl S, Heitefuss R, Apel K (1993) Thionin in cell walls and papillae of barley in compatible and incompatible interactions with *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 43: 343-352

- Eckey C, Korell M, Leib K, Biedenkopf D, Jansen C, Langen G, Kogel KH (2004) Identification of powdery mildew-induced barley genes by cDNA-AFLP: functional assessment of an early expressed MAP kinase. *Plant Molecular Biology* 55: 1-15
- Evert RF, Russin WA, Botha CEJ (1996) Distribution and frequency of plasmodesmata in relation to photoassimilate pathways and phloem loading in the barley leaf. *Planta* 198: 572-579
- Eynck C, Koopmann B, Karlovsky P, von Tiedemann A (2009) Internal resistance in winter oilseed rape inhibits systemic spread of the vascular pathogen *Verticillium longisporum*. *Phytopathology* 99: 802-811.
- Felle HH, Herrmann A, Hanstein S, Hückelhoven R, Kogel KH (2004) Apoplastic pH signaling in barley leaves attacked by the powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17: 118-123
- Felle HH, Zimmermann MR (2007) Systemic signalling in barley through action potentials. *Planta* 226: 203-214
- Fincher GB (2009) Revolutionary times in our understanding of cell wall biosynthesis and remodeling in the grasses. *Plant Physiology* 149: 27-37
- Fisahn J, Herde O, Willmitzer L, Peña-Cortés H (2004) Analysis of the transient increase in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  during the action potential of higher plants with high temporal resolution: Requirement of  $\text{Ca}^{2+}$  transients for induction of jasmonic acid biosynthesis and PINII gene expression. *Plant Cell Physiology* 45: 456-459
- Fisher DB und Frame JM (1984) A guide to the use of the exuding-stylet technique in phloem physiology. *Planta* 161: 385-393
- Fontanini D und Jones BL (2001) Study of Metallopeptidase Isozymes from Malted Barley (*Hordeum vulgare* cv. Morex). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 4903-4911
- Forslund K, Pettersson J, Bryngelsson T, Jonsson L (2000) Aphid infestation induces PR-proteins differently in barley susceptible or resistant to the birdcherry-oat aphid (*Rhopalosiphum padi*). *Physiologia Plantarum* 110: 496-502
- Freialdenhoven A, Peterhänsel C, Kurth J, Kreuzaler F, Schulze-Lefert P (1996) Identification of genes required for the function of non-race-specific *mlo* resistance to powdery mildew in barley. *The Plant Cell* 8: 5-14
- Freymark G, Diehl T, Miklis M, Romeis T, Panstruga R (2007) Antagonistic control of powdery mildew host cell entry by barley calcium-dependent protein kinases (CDPKs). *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20: 1213-1221
- Fromm J und Bauer T (1994) Action potentials in maize sieve tubes change phloem translocation. *Journal of Experimental Botany* 45: 463-469
- Fromm J und Eschrich N (1989) Correlation of ionic movements with phloem unloading and loading in barley leaves. *Plant Physiology and Biochemistry* 27: 577-585
- Fujiwara T, Giesman-Cookmeyer D, Ding B, Lommel SA, Lucas WJ (1993) Cell-to-cell trafficking of macromolecules through plasmodesmata potentiated by the red clover necrotic mosaic virus movement protein. *The Plant Cell* 5: 1783-1794
- Fukumori T und Chino M (1982) Sugar, amino acid and inorganic contents in rice phloem sap. *Plant and Cell Physiology* 23: 273-283
- Furch ACU, Hafke JB, Schulz A, van Bel AJE (2007)  $\text{Ca}^{2+}$ -mediated remote control of reversible sieve tube occlusion in *Vicia faba*. *Journal of Experimental Botany* 58: 2827-2838



- Furch ACU, van Bel AJE, Fricker MD, Felle HH, Fuchs M, Hafke JB (2009) Sieve Element  $\text{Ca}^{2+}$  channels as relay stations between remote stimuli and sieve tube occlusion in *Vicia faba*. *The Plant Cell* 21: 2118-2132
- Furch ACU, Zimmermann MR, Will T, Hafke JB, van Bel AJE (2010) Remote-controlled stop of phloem mass flow by biphasic occlusion in *Cucurbita maxima*. *Journal of Experimental Botany* 61: 3697-3708
- Garcia-Olmedo F, Molina A, Segura A, Moreno M (1995) The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. *Trends in Microbiology* 3: 72-74
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A (2005) Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. John M. Walker (ed): *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press
- Gaupels F, Buhtz A, Knauer T, Deshmukh S, Waller F, van Bel AJE, Kogel KH, Kehr J (2008) Adaptation of aphid styletomy for analyses of proteins and mRNAs in barley phloem sap. *Journal of Experimental Botany* 59: 3297-3306
- Gaupels F, Knauer T, van Bel AJE (2008) A combinatory approach for analysis of protein sets in barley sieve-tube samples using EDTA-facilitated exudation and aphid styletomy. *Journal of Plant Physiology* 165: 95-103
- Giavalisco P, Kapitza K, Kolasa A, Buhtz A, Kehr J (2006) Towards the proteome of *Brassica napus* phloem sap. *Proteomics* 6: 896-909
- Girousse C, Bonnemain JL, Delrot S, Bournoville R (1991) Sugar and amino acid composition of phloem sap of *Medicago sativa*: a comparative study of two collecting methods. *Plant Physiology and Biochemistry* 29: 41-48
- Gould N, Thorpe MR, Koroleva O, Minchin PEH (2005) Phloem hydrostatic pressure relates to solute loading rate: a direct test of the Münch hypothesis. *Functional Plant Biology* 32: 1019-1026
- Grayer RJ, Harborne JB (1994) A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982-1993. *Phytochemistry* 37: 19-42
- Gregersen PL, Thordal-Christensen H, Förster H, Collinge DB (1997) Differential gene transcript accumulation in barley leaf epidermis and mesophyll in response to attack by *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (syn. *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*). *Physiological and Molecular Plant Pathology* 51: 85-97
- Groussol J, Delrot S, Caruhel P, Bonnemain JL (1986) Design of an improved exudation method for phloem sap collection and its use for the study of phloem mobility of pesticides. *Physiologie Vegetale* 24: 123-134
- Guedes MEM, Richmond S, Kuć J (1980) Induced systemic resistance to anthracnose in cucumber as influenced by the location of the inducer inoculation with *Colletotrichum*. *Physiological Plant Pathology* 17: 229-233
- Haebel S und Kehr J (2001) Matrix-assisted desorption/ionization time of flight mass spectrometry peptide mass fingerprints and post source decay: a tool for the identification and analysis of phloem proteins from *Cucurbita maxima* Duch. separated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Planta* 213: 586-593
- Hafke JB, Furch ACU, Fricker MD, van Bel AJE (2009) Forisome dispersion in *Vicia faba* is triggered by  $\text{Ca}^{2+}$  hotspots created by concerted action of diverse  $\text{Ca}^{2+}$  channels in sieve elements. *Plant Signaling and Behavior* 4: 968-972
- Hamann T, Bennett M, Mansfield J, Somerville C (2009) Identification of cell-wall stress as a hexose-osmosensitive regulator of plant responses. *The Plant Journal* 57: 1015-1026

- Hao P, Liu C, Wang Y, Chen R, Tang M, Du B, Zhu L, He G (2008) Herbivore-induced callose deposition on the sieve plates of rice: An important mechanism for host resistance. *Plant Physiology* 146: 1810-1820
- Hause B, Demus U, Teichmann C, Parthier B, Wasternack C (1996) Developmental and tissue-specific expression of JIP-23, a jasmonate-inducible protein of barley. *Plant Cell Physiology* 37: 641-649
- Hause B, Kogel KH, Parthier B, Wasternack C (1997) In barley leaf cells, jasmonates do not act as a signal during compatible or incompatible interactions with the powdery mildew fungus (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*). *Journal of Plant Physiology* 150: 127-132
- Hause B, Maier W, Miersch O, Kramell R, Strack D (2002) Induction of jasmonate biosynthesis in arbuscular mycorrhizal barley roots. *Plant Physiology* 130: 1213-1220
- Hayashi H und Chino M (1986) Collection of pure phloem sap from wheat and its chemical composition. *Plant Cell Physiology* 27: 1387-1393
- Haywood V, Yu TS, Huang NC, Lucas WJ (2005) Phloem long-distance trafficking of gibberellic acid-insensitive RNA regulates leaf development. *The Plant Journal* 42: 49-68
- Heil M und Ton J (2008) Long-distance signalling in plant defence. *Trends in Plant Science* 13: 264-272
- Herde O, Atzorn R, Fisahn J, Wasternack C, Willmitzer L, Peña-Cortés H (1996) Localized wounding by heat initiates the accumulation of proteinase inhibitor II in abscisic acid-deficient plants by triggering jasmonic acid biosynthesis. *Plant Physiology* 11: 853-860
- Hoffmann-Benning S, Gage DA, McIntosh L, Kende H, Zeevaart JA (2002) Comparison of peptides in the phloem sap of flowering and non-flowering *Perilla* and lupine plants using microbore HPLC followed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Planta* 216: 140-147
- Howe GA und Jander G (2008) Plant immunity to insect herbivores. *Annual Review of Plant Biology* 59: 41-66
- Hückelhoven R, Fodor J, Preis C, Kogel KH (1999) Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with hydrogen peroxide but not with salicylic acid accumulation. *Plant Physiology* 119: 1251-1260
- Hückelhoven R und Kogel KH (2003) Reactive oxygen intermediates in plant-microbe interactions: Who is who in powdery mildew resistance? *Planta* 216: 891-902
- Hückelhoven R (2007) Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annual Review of Phytopathology* 45: 101-27
- Huffaker A, Pearce G, Ryan CA (2006) An endogenous peptide signal in *Arabidopsis* activates components of the innate immune response. *PNAS* 103: 10098-10103
- Jacobs AK, Lipka V, Burton RA, Panstruga R, Strizhov N, Schulze-Lefert P, Fincher GB (2003) An *Arabidopsis* callose synthase, GSL5, is required for wound and papillary callose formation. *The Plant Cell* 15: 2503-2513
- Jansen C, Korell M, Eckey C, Biedenkopf D, Kogel K (2005) Identification and transcriptional analysis of powdery-mildew induced barley genes. *Plant Science* 168: 373-380
- Jenns AE und Kuć J (1979) Graft transmission of systemic resistance of cucumbers to anthracnose induced by *Colletotrichum lagenarium* and tobacco necrosis virus. *Phytopathology* 69: 753-756
- Jørgensen JH (1992) Discovery, characterization and exploitation of Mlo powdery mildew resistance in barley. *Euphytica* 63: 141-152

- Kauss H, Köhle H, Jeblick W (1983) Proteolytic activation and stimulation by  $\text{Ca}^{2+}$  of glucan synthase from soybean cells. *FEBS Letters* 158: 84-88
- Kehr J (2006) Phloem sap proteins: their identities and potential roles in the interaction between plants and phloem-feeding insects. *Journal of Experimental Botany* 57: 767-774
- Kerby K und Somerville S (1989) Enhancement of specific intercellular peroxidases following inoculation of barley with *Erysiphe graminis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 35: 323-337
- Kidou S, Oikawa A, Sasaki N, Yasuda H, Yamashita T, Koiwa H, Kato K, Ejiri S (2006) Identification of a 23 kDa protein (P23k) related to the sugar supply in germinating barley seeds. *Plant Biotechnology* 23: 357-364
- Kim MC, Panstruga R, Elliott C, Müller J, Devoto A, Yoon HW, Park HC, Cho MJ, Schulze-Lefert P (2002) Calmodulin interacts with MLO protein to regulate defence against mildew in barley. *Nature* 416: 447-451
- King RW und Zeevaart JAD (1974) Enhancement of phloem exudation from cut petioles by chelating agents. *Plant Physiology* 53: 96-103
- Kogel KH, Beckhove U, Dreschers J, Münch S, Rommé Y (1994) Acquired resistance in barley. The resistance mechanisms induced by 2,6-dichloroisonicotinic acid is a phenocopy of a genetically based mechanism governing race-specific powdery mildew resistance. *Plant Physiology* 106: 1269-1277
- Kogel KH, Ortel B, Jarosch B, Atzorn R, Schiffer R, Wasternack C (1995) Resistance in barley against the powdery mildew fungus (*Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*) is not associated with enhanced levels of endogenous jasmonates. *European Journal of Plant Pathology* 101: 319-332
- Kogel KH und Langen G (2005) Induced disease resistance and gene expression in cereals. *Cellular Microbiology* 7: 1555-1564
- Köhle H, Jeblick W, Poten F, Blaschek W, Kauss H (1985) Chitosan-elicited callose synthesis in soybean cells as a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent process. *Plant Physiology* 77: 544-551
- Komiya Y, Suzuki S, Kunoh H (2003) Release of xylanase from conidia and germlings of *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* and expression of a xylanase gene. *The Journal of General Plant Pathology* 69: 109-114
- Koroleva OA, Farrar JF, Tomos AD, Pollock CJ (1998) Carbohydrates in individual cells of epidermis, mesophyll, and bundle sheath in barley leaves with changed export or photosynthetic rate. *Plant Physiology* 118: 1525-1532
- Kramell R, Miersch O, Atzorn R, Parthier B, Wasternack C (2000) Octadecanoid-derived alteration of gene expression and the "oxylipin signature" in stressed barley leaves. Implications for different signaling pathways. *Plant Physiology* 123: 177-187
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Li L, Li C, Lee GI, Howe GA (2002) Distinct roles for jasmonate synthesis and action in the systemic wound response of tomato. *PNAS* 99: 6416-6424
- Li J, Burton RA, Harvey AJ, Hrmova M, Wardak AZ, Stone BA, Fincher GB (2003) Biochemical evidence linking a putative callose synthase gene with (1,3)- $\beta$ -D-glucan biosynthesis in barley. *Plant Molecular Biology* 53: 213-225
- Lin MK, Lee YJ, Lough TJ, Phinney BS, Lucas WJ (2009) Analysis of the pumpkin phloem proteome provides insights into angiosperm sieve tube function. *Molecular and Cellular Proteomics* 8: 343-356
- Liu DD, Chao WM, Turgeon R (2012) Transport of sucrose, not hexose, in the phloem. *Journal of Experimental Botany* 63: 4315-4320

- Ma R, Reese JC, Black WC, Bramel-Cox P (1990) Detection of pectinesterase and Polygalacturonase from salivary secretions of living greenbug, *Schizaphis graminum* (Homoptera: Aphididae). *Journal of Insect Physiology* 36: 507-512
- Maldonado AM, Doerner P, Dixon RA, Lamb CJ, Cameron RK (2002) A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in *Arabidopsis*. *Nature* 419: 399-403
- Marentes E und Grusak MA (1998) Mass determination of low-molecular-weight proteins in phloem sap using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Experimental Botany* 195: 903-911
- Matsiliza B und Botha CEJ (2002) Aphid (*Sitobion yakini*) investigation suggests thin-walled sieve tubes in barley (*Hordeum vulgare*) to be more functional than thick-walled sieve tubes. *Physiologia Plantarum* 115: 137-143
- Matsuo H, Taniguchi K, Hiramoto T, Yamada T, Ichinose Y, Toyoda K, Takeda K, Shiraishi T (2001) Gramine increase associated with rapid and transient systemic resistance in barley seedlings induced by mechanical and biological stresses. *Plant Cell Physiology* 42: 1103-1111
- Méchin V, Consoli L, Le Guilloux M, Damerval C (2003) An efficient solubilization buffer for plant proteins focused in immobilized pH gradients. *Proteomics* 3: 1299-1302
- Métraux JP, Signer H, Ryals J, Ward E, Wyss-Benz M, Gaudin J, Raschdorf K, Schmid E, Blum W, Inverardi B (1990) Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* 250: 1004-1006
- Miles PW (1999) Aphid saliva. *Biological Reviews* 74: 41-85
- Mitchell AF und Walters DR (2004) Potassium phosphate induces systemic protection in barley to powdery mildew infection. *Pest Management Science* 60: 126-134
- Moloi MJ und van der Westhuizen AJ (2006) The reactive oxygen species are involved in resistance responses of wheat to the Russian wheat aphid. *Journal of Plant Physiology* 163: 1118-1125
- Moscatiello R, Mariani P, Sanders D, Maathuis FJM (2006) Transcriptional analysis of calcium-dependent and calcium-independent signalling pathways induced by oligogalacturonides. *Journal of Experimental Botany* 57: 2847-2865
- Münch E. (1930) *Die Stoffbewegungen in der Pflanze*. Gustav Fischer, Jena
- Nakamura SI, Hayashi H, Mori S, Chino M (1995) Detection and Characterization of Protein Kinases in Rice Phloem Sap. *Plant Cell Physiology* 36: 19-27
- Narváez-Vásquez J, Pearce G, Orozco- Cárdenas ML, Franceschi VR, Ryan CA (1995) Autoradiographic and biochemical evidence for the systemic translocation of systemin in tomato plants. *Planta* 195: 593-600
- Ni X, Quisenberry SS, Pornkulwat S, Figarola JL, Skoda SR, Foster JE (2000) Hydrolase and oxidoreductase activities in *Diuraphis noxia* and *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae). *Annals of the Entomological Society of America* 93: 595-601
- Ni X, Quisenberry SS, Heng-Moss T, Markwell JP, Sarath G, Klucas R, Baxendale FP (2001) Oxidative responses of resistant and susceptible cereal leaves to symptomatic and nonsymptomatic cereal aphid (Homoptera: Aphididae) feeding. *Journal of Economic Entomology* 94: 743-751
- Niki T, Mitsuhashi I, Seo S, Ohtsubo N, Ohashi Y (1998) Antagonistic Effect of Salicylic Acid and Jasmonic Acid on the Expression of Pathogenesis-Related (PR) Protein Genes in Wounded Mature Tobacco Leaves. *Plant Cell Physiology* 39: 500-507
- Oikawa A, Rahman A, Yamashita T, Taira H, Kidou S (2007a) Virus-induced gene silencing of P23k in barley leaf reveals morphological changes involved in secondary wall formation. *Journal of Experimental Botany* 58: 2617-2625

- Oikawa A, Yamashita T, Taira H, Ejiri S, Kidou S (2007b) Jasmonate-induced 23kD protein, JIP-23, is involved in seed development of barley. *Plant Biotechnology* 24: 217-220
- Oikawa A, Nagai K, Kato K, Kidou S (2009) Gene silencing of barley P23k involved in secondary wall formation causes abnormal tiller formation and intercalary elongation. *Breeding Science* 59: 664-670
- Omid A, Keilin T, Glass A, Leshkowitz D, Wolf S (2007) Characterization of phloem-sap transcription profile in melon plants. *Journal of Experimental Botany* 58: 3645-3656
- Opalski KS, Schultheiss H, Kogel KH, Hückelhoven R (2005) The receptor-like MLO protein and the RAC/ROP family G-protein RACB modulate actin reorganization in barley attacked by the biotrophic powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*. *The Plant Journal* 41: 291-303
- Orozco-Cárdenas M, Ryan CA (1999) Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *PNAS* 96: 6553-6557
- Orozco-Cárdenas ML, Narváez-Vásquez J, Ryan CA (2001) Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin and methyl jasmonate. *The Plant Cell* 13: 179-191
- Osbourn AE (1996) Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *The Plant Cell* 8: 1821-1831
- Ouchi S, Hibino S, Oku H (1976) Effect of earlier inoculation on the establishment of a subsequent fungus as demonstrated in powdery mildew of barley by a triple inoculation procedure. *Physiological Plant Pathology* 9: 25-32
- Pascholati SF, Yoshioka H, Kunoh H, Nicholson RL (1992) Preparation of the infection court by *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*: cutinase is a component of the conidial exudate. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 41: 53-59
- Passardi F, Penel C, Dunand C (2004) Performing the paradoxical: How plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in Plant Science* 9: 534-540
- Pate JS (1980) Transport and partitioning of nitrogenous solutes. *Annual Review of Plant Physiology* 31: 313-340
- Pearce G, Strydom D, Johnson S, Ryan CA (1991) A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science* 253: 895-897
- Peña-Cortés H, Albrecht T, Prat S, Weiler EW, Willmitzer L (1993) Aspirin prevents wound-induced gene expression in tomato leaves by blocking jasmonic acid biosynthesis. *Planta* 191: 123-128
- Peterhänsel C, Freialdenhoven A, Kurth J, Kolsch R, Schulze-Lefert P (1997) Interaction analyses of genes required for resistance responses to powdery mildew in barley reveal distinct pathways leading to leaf cell death. *The Plant Cell* 9: 1397-1409
- Poehling HM und Neuhoﬀ V (1981) Visualization of proteins with a silver "stain": A critical analysis. *Electrophoresis* 2: 141-147
- Prats E, Mur LAJ, Sanderson R, Carver TLW (2005) Nitric oxide contributes both to papilla-based resistance and the hypersensitive response in barley attacked by *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *Molecular Plant Pathology* 6: 65-78
- Pryce-Jones E, Carver T, Gurr SJ (1999) The roles of cellulase enzymes and mechanical force in host penetration by *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*: 55: 175-182
- Rampitsch C, Bykova N, McCallum B, Beimcik E, Ens W (2006) Analysis of the wheat and *Puccinia triticina* (leaf rust) proteomes during a susceptible hostpathogen interaction. *Proteomics* 6: 1897-1907



- Riesmeier JW, Willmitzer L, Frommer WB (1992) Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *EMBO Journal* 11: 4705-4713
- Riesmeier JW, Willmitzer L, Frommer WB (1994) Evidence for an essential role of the sucrose transporter in phloem loading and assimilate partitioning. *EMBO Journal* 13: 1-7
- Robert-Seilanianz A, Grant M, Jones JDG (2011) Hormone crosstalk in plant disease and defense: More than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annual Review of Phytopathology*. 49: 317-343
- Ross AF (1961) Systemic acquired resistance induced by localized virus infection in plants. *Virology*: 14
- Roulin S, Buchala AJ, Fincher GB (2002) Induction of (1,3;1,4)- $\beta$ -D-glucan hydrolases in leaves of dark-incubated barley seedlings. *Planta* 215: 51-59
- Ruiz-Medrano R, Xoconostle-Cázares B, Lucas WJ (1999) Phloem long-distance transport of mNACP mRNA: implications for supracellular regulation in plants. *Development* 126: 4405-4419
- Saheed SA und Botha CEJ (2010) *Rhopalosiphum padi* feeding - attempted symptomatic defence mechanisms in barley leaves include wound callose deposition? *Notulae Scientia Biologicae* 2: 67-71
- Saheed SA, Botha CEJ, Liu L, Jonsson L (2007) Comparison of structural damage caused by Russian wheat aphid (*Diuraphis noxia*) and Bird cherry-oat aphid (*Rhopalosiphum padi*) in a susceptible barley cultivar, *Hordeum vulgare* cv. Clipper. *Physiologia Plantarum* 129: 429-435
- Saheed SA, Cierlik I, Larsson KAE, Delp G, Bradley G, Jonsson LMV, Botha CEJ (2009) Stronger induction of callose deposition in barley by Russian wheat aphid than bird cherry-oat aphid is not associated with differences in callose synthase or  $\beta$ -1,3-glucanase transcript abundance. *Physiologia Plantarum* 135: 150-161
- Sasaki T, Chino M, Hayashi H, Fujiwara T (1998) Detection of several mRNA species in rice phloem sap. *Plant and Cell Physiology* 39: 895-897
- Schenk PM, Kazan K, Wilson I, Anderson JP, Richmond T, Somerville SC, Manners JM (2000) Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *PNAS* 97: 11655-11660
- Schlösser E (1997) Allgemeine Phytopathologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Schobert C, Baker L, Szederkényi J, Großmann P, Komor E, Hayashi H, Chino M, Lucas WJ (1998) Identification of immunologically related proteins in sieve-tube exudate collected from monocotyledonous and dicotyledonous plants. *Planta* 206: 245-252
- Schobert C, Großmann P, Gottschalk M, Komor E, Pecsvaradi A, zur Nieden U (1995) Sieve-tube exudate from *Ricinus communis* L. seedlings contains ubiquitin and chaperones. *Planta* 196: 205-210
- Scholes JD, Lee PJ, Horton P, Lewis DH (1994) Invertase: understanding changes in the photosynthetic and carbohydrate metabolism of barley leaves infected with powdery mildew. *New Phytologist* 126: 213-222
- Schultheiss H, Dechert C, Király L, Fodor J, Michel K, Kogel KH, Hükelhoven R (2003) Functional assessment of the pathogenesis-related protein PR-1b in barley. *Plant Science* 165: 1275-1280
- Schweizer P, Cees R, Mosinger E (1993) Effect of jasmonic acid on the interaction (*Hordeum vulgare* L) with the powdery *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Plant Physiology* 102: 503-511
- Scott-Craig JS, Kerby KB, Stein BD, Somerville SC (1995) Expression of an extracellular peroxidase that is induced in barley (*Hordeum vulgare*) by the powdery mildew pathogen (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*). *Physiological and Molecular Plant Pathology* 47: 407-418
- Selitrennikoff CP (2001) Antifungal proteins. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2883-2894



- Sjölund RD (1997) The phloem sieve element: A river runs through it. *Plant Cell* 9: 1137-1146
- Spoel SH, Koornneef A, Claessens SMC, Korzelius JP, van Pelt JA, Mueller MJ, Buchala AJ, Métraux JP, Brown R, Kazan K, van Loon LC, Dong X, Pieterse CMJ (2003) NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *The Plant Cell* 15: 760-770
- Stadler R, Wright KM, Lauterbach C, Amon G, Gahrtz M, Feuerstein A, Oparka KJ, Sauer N (2005) Expression of GFP-fusions in *Arabidopsis* companion cells reveals non-specific protein trafficking into sieve elements and identifies a novel post-phloem domain in roots. *The Plant Journal* 41: 319-331
- Stanbridge B, Gay JL, Wood RKS. (1971) Gross and fine structural changes in *Erysiphe graminis* and barley before and during infection. *The Ecology of Leaf Surface Micro-organisms*. Preece, TF und Dickinson CH, London and New York, Academic Press: 367-379
- Strahler JR, Hanash SM, Somerlot L, Bjellqvist B, Görg A (1988) Effect of salt on the performance of immobilized pH gradient isoelectric focusing gels. *Electrophoresis* 9: 74-80
- Suzuki S, Komiya Y, Mitsui T, Tsuyumu S, Kunoh H, Carver TLW, Nicholson RL (1998) Release of cell wall degrading enzymes from conidia of *Blumeria graminis* on artificial substrata. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 64: 160-167
- Suzuki S, Komiya Y, Mitsui T, Tsuyumu S, Kunoh H (1999) Activity of pectinases in conidia and germlings of *Blumeria graminis* and the expression of genes encoding pectinases. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 65: 131-139
- Tamaki S, Matsuo S, Ling Wong H, Yokoi S, Shimamoto K (2007) Hd3a protein is a mobile flowering signal in rice. *Science* 316: 1033-1036
- Taoka KI, Ham BK, Xoconostle-Cázares B, Rojas MR, Lucas WJ (2007) Reciprocal phosphorylation and glycosylation recognition motifs control NCAPP1 interaction with pumpkin phloem proteins and their cell-to-cell movement. *The Plant Cell* 19: 1866-1884
- Thompson GA und Goggin FL (2006) Transcriptomics and functional genomics of plant defence induction by phloem-feeding insects. *Journal of Experimental Botany* 57: 755-766
- Thordal-Christensen H und Smedegård-Petersen V (1988) Comparison of resistance-inducing abilities of virulent and avirulent races of *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* and a race of *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici* in barley. *Plant Pathology* 37: 20-27
- Thordal-Christensen H, Brandt J, Cho BH, Rasmussen SK, Gregersen PL, Smedegaard-Petersen V, Collinge DB (1992) cDNA cloning and characterization of two barley peroxidase transcripts induced differentially by the powdery mildew fungus *Erysiphe graminis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 40: 395-409
- Thordal-Christensen H, Zhang Z, Wei Y, Collinge DB (1997) Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *The Plant Journal* 11: 1187-1194
- Thordal-Christensen H (2003) Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 351-357
- Tjallingii WF und Hogen-Esch TH (1993) Fine structure of aphid stylet routes in plant tissues in correlation with EPG signals. *Physiological Entomology* 18: 317-328
- Tjallingii WF (2006) Salivary secretions by aphids interacting with proteins of phloem wound responses. *Journal of Experimental Botany* 57: 739-745
- Tully RE und Hanson AD (1979) Amino acids translocated from turgid and water-stressed barley leaves. *Plant Physiology* 64: 460-466
- Uknes S, Mauch-Mani B, Moyer M, Potter S, Williams S, Dincher S, Chandler D, Slusarenko A, Ward E, Ryals J (1992) Acquired resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 4: 645-656

- Vallélian-Bindschedler V, Métraux JP, Schweizer P (1998) Salicylic acid accumulation in barley is pathogen specific but not required for defense-gene activation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11: 702-705
- van Bel AJE, Ammerlaan A, van Dijk AA (1994) A three-step screening procedure to identify the mode of phloem loading in intact leaves: evidence for symplasmic and apoplasmic phloem loading associated with the type of companion cell. *Planta* 192: 31-39
- van Bel AJE (2003) The phloem, a miracle of ingenuity. *Plant, Cell and Environment* 26: 125-149
- van Bel AJE und Hess P (2003) Kollektiver Kraftakt zweier Exzentriker. *Biologie Unserer Zeit* 4: 220-230
- van Bel AJE (2006) Sieve-pore plugging mechanisms. In: *Cell-Cell Channels*. editors: Baluska F, Volkmann D, Barlow PW Springer Science, Bioscience Section V: 113-118
- van Bel AJE und Hess PH (2008) Hexoses as phloem transport sugars: the end of a dogma? *Journal of Experimental Botany* 59: 261-272
- van Bel AJE, Knoblauch M, Furch ACU, Hafke JB (2011) (Questions)n on phloem biology. 1. Electropotential waves,  $Ca^{2+}$  fluxes and cellular cascades along the propagation pathway. *Plant Science* 181: 210-218
- van der Westhuizen AJ, Qian XM, Botha AM (1998) Differential induction of apoplastic peroxidase and chitinase activities in susceptible and resistant wheat cultivars by Russian wheat aphid infestation. *Plant Cell Reports* 18: 132-137
- van Helden M, Tjallingh WF, van Beek TA (1994) Phloem sap collection from lettuce (*Lactuca sativa* L.): chemical comparison among collection methods. *Journal of Chemical Ecology* 20: 3191-3206
- van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 44: 135-62
- van Wees SCM, Luijendijk M, Smoorenburg I, van Loon LC, Pieterse CMJ (1999) Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene *Atvsp* upon challenge. *Plant Molecular Biology* 41: 537-549
- van Wees SCM, de Swart EAM, van Pelt JA, van Loon LC, Pieterse CMJ (2000) Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS* 97: 8711-8716
- Vernooij B, Friedrich L, Morse A, Reist R, Kolditz-Jawhar R, Ward E, Uknes S, Kessmann H, Ryals J (1994) Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. *The Plant Cell* 6: 959-965
- Vlot AC, Dempsey D'MA, Klessig DF (2009) Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology* 47: 177-206
- von Röpenack E, Parr A, Schulze-Lefert P (1998) Structural analyses and dynamics of soluble and cell wall-bound phenolics in a broad spectrum resistance to the powdery mildew fungus in barley. *Journal of Biological Chemistry* 272: 9013-9022
- Waller F, Achatz B, Baltruschat H, Fodor J, Becker K, Fischer M, Heier T, Hückelhoven R, Neumann C, von Wettstein D, Franken P, Kogel KH (2005) The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *PNAS* 102: 13386-13391
- Walters D, Cowley T, Mitchell A (2002) Methyl jasmonate alters polyamine metabolism and induces systemic protection against powdery mildew infection in barley seedlings. *Journal of Experimental Botany* 53: 747-756

- Walz C, Juenger M, Schad M, Kehr J (2002) Evidence for the presence and activity of a complete antioxidant defence system in mature sieve tubes. *The Plant Journal* 31: 189-197
- Ward ER, Uknes SJ, Williams SC, Dincher SS, Wiederhold DL, Alexander DC, Ahl-Goy P, Métraux JP, Ryals JA (1991) Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *The Plant Cell* 3: 1085-1094
- Wei Y, Zhang Z, Andersen CH, Schmelzer E, Gregersen PL, Collinge DB, Smedegaard-Petersen V, Thordal-Christensen H (1998) An epidermis/papilla-specific oxalate oxidase-like protein in the defence response of barley attacked by the powdery mildew fungus. *Plant Molecular Biology* 36: 101-112
- Weibull J, Ronquist F, Brishammar S (1990) Free Amino acid composition of leaf exudates and phloem sap. *Plant Physiology* 92: 222-226
- Weschke W, Panitz R, Sauer N, Wang Q, Neubohn B, Weber H, Wobus U (2000) Sucrose transport into barley seeds: molecular characterization of two transporters and implications for seed development and starch accumulation. *Plant Journal* 21: 455-467
- Wessel D und Flügge UI (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Analytical Biochemistry* 138: 141-143
- Wiese J, Kranz T, Schubert S (2004) Induction of pathogen resistance in barley by abiotic stress. *Plant Biology* 6: 529-536
- Will T. und van Bel AJE (2006) Physical and chemical interactions between aphids and plants. *Journal of Experimental Botany* 57: 729-737
- Will T, Tjallingii WF, Thönnessen A, van Bel AJE (2007) Molecular sabotage of plant defense by aphids. *PNAS* 104: 10536-10541
- Will T, Kornemann SR, Furch ACU, Tjallingii WF, van Bel AJE (2009) Aphid watery saliva counteracts sieve-tube occlusion: a universal phenomenon? *The Journal of Experimental Biology* 212: 3305-3312
- Winter H, Lohaus G, Heldt HW (1992) Phloem Transport of amino acids in relation to their cytosolic levels in barley leaves. *Plant Physiology* 99: 996-1004
- Wright AJ, Carver TLW, Thomas BJ, Fenwick NID, Kunoh H, Nicholson RL (2000) The rapid and accurate determination of germ tube emergence site by *Blumeria graminis* conidia. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57: 281-301
- Yalpani N, Silverman P, Willson TMA, Kleier DA, Raskin I (1991) Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco. *Plant Cell* 3: 809-818
- Yan L, Fu D, Li C, Blechl A, Tranquilli G, Bonafede M, Sanchez A, Valarik M, Yasuda S, Dubcovsky J (2006) The wheat and barley vernalization gene VRN3 is an orthologue of FT. *PNAS* 103: 19581-19586
- Ye XS, PAN SQ, Kuć J (1989) Pathogenesis-related proteins and systemic resistance to blue mould and tobacco mosaic virus induced by tobacco mosaic virus, *Peronospora tabacina* and aspirin. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 35: 161-175
- Ye XS, PAN SQ, Kuć J (1990) Association of pathogenesis-related proteins and activities of peroxidase,  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase with systemic induced resistance to blue mould of tobacco but not to systemic tobacco mosaic virus. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 36: 523-531
- Yust HR, Fulton RA (1943) An exudation associated with the feeding location of the california red scale. *Journal of Economic Entomology*. 36: 346-347
- Zhang N und Jones BL (1995) Characterization of germinated barley endoproteolytic enzymes by two-dimensional gel electrophoresis. *Journal of Cereal Science* 21: 145-153

Zhang S und Klessig DF (2001) MAPK cascades in plant defense signaling. Trends in Plant Science 6: 520-527

Zhang Z, Collinge DB, Thordal-Christensen H (1995) Germin like oxalate oxidase, a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producing enzyme, accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus. Plant Journal 8: 139-145

## Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. van Bel für die unkomplizierte Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die wirklich anregenden Diskussionen bei den anonymen Botanikern bedanken. Ich hoffe, ich konnte die meisten Ideen von Ihnen umsetzen.

Ebenso danke ich allen Kollegen aus der Botanik für die freundschaftliche Aufnahme in das Institutsteam.

Bei Herrn Prof. Dr. Kogel und seinen Mitarbeitern aus dem IPAZ möchte ich mich für die Versorgung mit Saatgut und Mehltau bedanken.

Als nächstes geht mein Dank an Dietmar Haffer, Bettina Fischer und Dieter Koch für die Anzucht der Pflanzen und die kurzweiligen Pausen hinter dem Gewächshaus.

Für die vielen Stylektomieracks und tausend andere Basteleien geht mein Dank an das Werkstattteam: Werner Uhmann, Andreas Reh, Stefan Balser und Thomas Wagner.

Hella Krufczik und Hess Paul danke ich für die Unterstützung bei der HPLC, Angelika Hofmann und Edith Bingenheimer für die Beantwortung aller bürokratischer Fragen und Katrin Ehlers für die Beantwortung aller Fragen, die mein botanisches Wissen im Grundpraktikum erweitert haben. Bei Hildegard Wack bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Reinigung der Glasmaterialien und bei Helene Frisch für die Unterstützung bei Institutsfeiern.

Meinen Jüngern Ilona Herrig und Moritz Gorski danke ich für die Unterstützung im „toxic-protein-lab“.

Meiner „rose garden“ Kollegin Kathrin Steckbauer danke ich für den Erfahrungsaustausch bezüglich der zweidimensionalen Proteintrennung und die unterhaltsamen Freitage im Sozialraum. Bei Jens Hafke und Matthias Zimmermann bedanke ich mich für die Diskussionen über neuartige elektrische Signale. Bei Matze natürlich auch für die Geheimforschung, die zur R2D2-Revolution geführt hat. Torsten Will und Emilio Sarria Villada danke ich für die vielen Methodentips und den wirklich speziellen Laborhumor.

Besonderer Dank gilt natürlich meinen Bürokolleginnen Alexandra Furch und Angela Hewer. Ich könnte hier viel aufzählen, aber Hauptsache wir haben zusammen den Balkon unsicher gemacht.

Zum Schluss möchte ich mich natürlich auch bei meinen Eltern und bei meiner Oma für die einwandfreien Sonntagsessen, die abwechslungsreichen Wochenendaufträge und die finanzielle Unterstützung bedanken.

## Persönliche Angaben

---

Torsten Knauer

## Studium und Beruf

---

seit 2006	Anfertigung der Dissertation zum Thema „Proteinbiochemische Untersuchungen des Siebröhrensaftes von <i>Hordeum vulgare</i> zur Identifizierung von systemischen Signalen für eine erhöhte Resistenz nach Befall mit <i>Blumeria graminis</i> “  Wissenschaftlicher Mitarbeiter/Doktorand, AG „Zellbiologie der Pflanze“ - Prof. Dr. Aart J. E. van Bel, Institut für Allgemeine Botanik, Justus-Liebig-Universität Gießen
2004	Abschluss als Diplom-Biologe
2002	Aufnahme der Diplomarbeit am Institut für Pflanzenphysiologie an der Justus-Liebig-Universität Gießen, AG HD Dr. Christoph Forreiter „Phototropin induzierte Blaulichtperzeption in <i>Arabidopsis thaliana</i> “
1995-2002	Studium der Biologie an der Justus-Liebig-Universität Gießen

## Schulausbildung

---

1991-1994	Werner-von-Siemens-Schule Wetzlar, Berufliches Gymnasium, Schwerpunkt Elektrotechnik
-----------	--



## Erklärung

---

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, 08.10.2012

